

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

23. 1. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

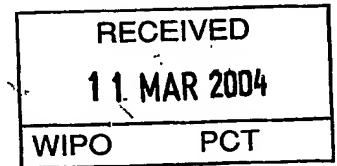
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 1月24日

出願番号
Application Number: 特願2003-016790

[ST. 10/C]: [JP 2003-016790]

出願人
Applicant(s): エーザイ株式会社

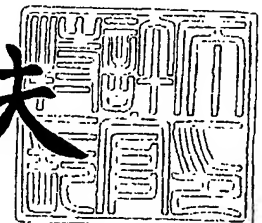


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 2月26日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2004-3013678

【書類名】 特許願

【整理番号】 E1-A0211

【提出日】 平成15年 1月24日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

【住所又は居所】 茨木市下穂積 1 - 2 - 3 0 - 4 0 3

【氏名】 尾野 雄一

【発明者】

【住所又は居所】 京都市左京区下鴨蓼倉町 1 9 - 3 中川方

【氏名】 皆木 康子

【発明者】

【住所又は居所】 京都市右京区西京極佃町 1 3 番地 ラセットアベニュー
7 0 7

【氏名】 坂本 佳正

【発明者】

【住所又は居所】 奈良県大和郡山市新町 3 0 5 - 7

【氏名】 水原 英理

【発明者】

【住所又は居所】 京都市下京区高辻通大宮東入五坊大宮町 9 0 真徳ハイ
ツ 5 0 7

【氏名】 中谷 智哉

【特許出願人】

【識別番号】 000000217

【氏名又は名称】 エーザイ株式会社

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 Lrp4/Corinドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞マーカー

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(1)～(5)の塩基配列から選択される配列を含むドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞マーカーポリヌクレオチドプローブ。

(1) 配列番号:1または2の塩基配列に相補的な塩基配列

(2) 配列番号:3または4記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列に相補的な塩基配列

(3) 配列番号:3または4記載のアミノ酸配列において膜貫通領域を欠く配列をコードする塩基配列に相補的な塩基配列

(4) 配列番号:1または2の塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列

(5) 上記(1)～(4)の配列中の少なくとも連続した15塩基を含む塩基配列

【請求項2】 以下の(1)～(6)から選択されるポリペプチドに対する抗体。

(1) 配列番号:1または2の塩基配列によりコードされるポリペプチド

(2) 配列番号:3または4記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド

(3) 配列番号:3または4記載のアミノ酸配列において膜貫通領域を欠くアミノ酸配列からなるポリペプチド

(4) 配列番号:3または4記載のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド

(5) 配列番号:1または2の塩基配列に相補的な配列に対してストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列によりコードされるポリペプチド

(6) 上記(1)～(5)のポリペプチドの断片であり、少なくとも8アミノ酸残基を有するポリペプチド

【請求項3】 ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択する方法であって、請求項1記載のポリヌクレオチドとドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接触させる工程を含む方法。

【請求項4】 ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択する方法であって、請求項2記載の抗体とドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含むと考えら

れる細胞試料とを接触させる工程を含む方法。

【請求項5】 以下の工程を含むドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択する方法。

(1)請求項3または4記載のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択する方法によりドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択する工程

(2)上記(1)において選択された前駆細胞を培養する工程

(3)上記(2)において培養された前駆細胞を、分裂停止後のニューロンマーカーを用いてスクリーニングする工程

【請求項6】 請求項3乃至5記載の方法により選択された分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞。

【請求項7】 ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的遺伝子及び前駆細胞からドーパミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離方法であって、請求項6記載の前駆細胞または該前駆細胞から分化、誘導若しくは増殖された細胞を用い、該細胞において特異的に発現している遺伝子を検出、単離する工程を含む方法。

【請求項8】 成熟を指標としたスクリーニング方法であり、請求項6記載の前駆細胞に対し、被験物質を接触させる工程、及び接触による前駆細胞の分化または増殖を検出する工程を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、分裂停止前のドーパミン産生ニューロン前駆細胞(progenitor)において発現している遺伝子としてLrp4を同定したことにより完成された。該遺伝子の発現または該遺伝子によりコードされる膜貫通蛋白質の発現を検出することにより、パーキンソン病(PD)等の神経変性疾患の移植治療において用いられるドーパミン産生ニューロン前駆細胞を効率的に分離することができる。

【0002】

【従来の技術】

ドーパミン系は、哺乳動物の脳において重要な運動調節、ホルモン分泌調節、

情動調節等に関与する非常に重要な系である。従って、ドーパミン作動性神経伝達における異常は、様々な神経系の障害を引き起こす。例えば、パーキンソン病(PD)は、中脳黒質のドーパミン産生ニューロンの特異的な脱落が原因で起こる錐体外路系の神経変性疾患である(HARRISON' S PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE 第2巻 第23版, Isselbacher et al. 編, McGraw-Hill Inc., NY (1994) pp.2275-7)。パーキンソン病の治療法としては、産生されるドーパミン量の低下を補うためにL-DOPA(3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン)を経口投与する方法が主に採られているが、効果の持続性が良くないことが知られている。

【0003】

最近では失われたドーパミン産生ニューロンを補うために、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含む6~9週齢の中絶胎児の中脳腹側領域を移植する治療法も試みられている(米国特許第5690927号; Spencer et al. (1992) N. Engl. J. Med. 327: 1541-8; Freed et al. (1992) N.Engl. J. Med. 327: 1549-55; Widner et al. (1992) N. Engl. J. Med. 327: 1556-63; Kordower et al. (1995) N. Engl. J. Med. 332: 1118-24; Defer et al. (1996) Brain 119: 41-50; Lopez-Lozano et al. (1997) Transp. Proc. 29: 977-80)。しかし、現在のところ、この方法では細胞の供給面、倫理面(Rosenstain (1995) Exp. Neurol. 33: 106; Turner et al. (1993) Neurosurg. 33: 1031-7)で問題があると共に、感染汚染の危険性、免疫学的な移植片拒絶(Lopez-Lozano et al. (1997) Transp. Proc. 29: 977-80; Widner and Brudin (1988) Brain Res. Rev. 13: 287-324)、胎児組織が糖分解よりも脂質代謝に主に依存しているための生存率の低さ(Rosenstein (1995) Exp. Neurol. 33: 106)等の様々な面で問題が指摘されている。

【0004】

倫理面や供給不足の問題を解決するために、例えばブタ由来の皮質、線条、及び中脳細胞を用いる方法等も提案されている(例えば、特表平10-508487号公報; 特表平10-508488号公報; 特表平10-509034号公報参照)。この方法においては、細胞表面上の抗原(MHCクラスI抗原)を改変するという煩雑な操作が必要とされる。そこで、中絶胎児由来の細胞に代えて、胚性幹細胞(ES)細胞、骨髄間質細胞などの非神経系細胞からのin vitroにおけるドーパミン産生ニューロンの分化系の利

用が有望視されている。将来的にはES細胞若しくは患者本人の持つ神経幹細胞からの再生治療の重要性が増してくるものと思われる。移植片拒絶を解消する方法としては、例えば、セルトリー細胞を同時に移植することにより、局在的に免疫抑制する方法も提案されている(特表平11-509170号公報;特表平11-501818号公報;Selawry and Cameron (1993) Cell Transplant 2: 123-9)。MHCがマッチする血縁者、他人の骨髄、骨髄バンク、及び臍帯血バンク等から移植細胞を得ることも可能であるが、患者自身の細胞を用いることができれば、余計な操作や手間なしに拒絶反応の問題も解決することができる。

【0005】

その他、問題となるのは、ニューロン前駆細胞が不均一な細胞集団へと分化する可能性がある点である。パーキンソン病の治療においては、カテコールアミン含有ニューロンの中でもドーパミン産生ニューロンを選択的に移植することが必要である。これまで、パーキンソン病の治療に用いることが提案されている移植細胞としては、線条体(Lindvall et al. (1989) Arch. Neurol. 46: 615-31; Widner et al. (1992) N. Engl. J. Med. 327: 1556-63)、ヒト胎児神経由来の不死化セルライン(特表平8-509215号公報;特表平11-506930号公報;特表2002-522070号公報)、NT2Z細胞の有糸分裂後ヒトニューロン(特表平9-5050554号公報)、ニューロン始原細胞(特表平11-509729号公報)、ドーパミン等のカテコールアミンを産生するように外来遺伝子によりトランスフェクトされた細胞、骨髄ストロマ細胞(特表2002-504503号公報;特表2002-513545号公報)等が挙げられる。しかしながらいずれも、ドーパミン産生ニューロンまたはドーパミン産生ニューロンへと分化する細胞のみを含むものではない。

【0006】

未分化な細胞集団からドーパミン産生ニューロンを選択的に濃縮・分離する方法としては、ドーパミン産生ニューロンで発現するチロシンヒドロキシラーゼ等の遺伝子のプロモーター／エンハンサーの制御下で蛍光蛋白質を発現するレポーター遺伝子を細胞集団の各細胞に導入し、蛍光を発する細胞を分離することにより、ドーパミン産生ニューロンを生きたまま可視化して濃縮・分離、または同定する方法(特開2002-51775号公報)が提案されている。この方法は、外来遺伝子

の導入という煩雑な工程を不可欠とするものであり、さらに、遺伝子治療に用いることを目的とする場合、レポーター遺伝子の存在は毒性、免疫原性の面からも問題である。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

現時点でのPD移植治療における大きな問題の一つは、中絶胎児の中脳腹側領域あるいはin vitroで分化誘導したドーパミン産生ニューロン前駆細胞は、いずれも多種の細胞の混合物である点である。神経回路形成における安全性を考えると、目的の細胞種のみを分離してから用いるのが望ましく、また腫瘍形成の危険性を考慮すれば、分裂停止後の神経細胞を分離してから使用することが良いと考えられる。さらに、細胞の移植先の脳内での生存や、正しくネットワーク形成する能力を考えると、より早期の前駆細胞を分離することにより治療効果を増大させ得ると期待される。そこで、本発明者は、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的な遺伝子の単離を試みた。そして既に、分裂停止直後の神経前駆細胞で一過性に発現する遺伝子の一つとして、新規遺伝子65B13の単離に成功し、特許出願した(特願2002-307573号)。

【0008】

【課題を解決するための手段】

ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的な遺伝子を単離するために、E12.5マウス中脳腹側領域を背腹方向にさらに2つの領域に切り分けて、ドーパミン産生ニューロンを含む最も腹側の領域に特異的に発現する遺伝子をサブトラクション法(N-RDA; representational difference analysis法; RDA法(Listsyn NA (1995) Trends Genet. 11:303-7)を改良(「DNA断片の量の均一化方法及びサブストラクション法」特願2001-184757(出願日2001/6/19))により同定した。単離した断片の一つはLrp4/CorinをコードするcDNA断片であった。Lrp4はII型膜貫通蛋白質をコードしている(図1)。

【0009】

in situハイブリダイゼーションによる発現解析の結果、Lrp4は中脳ではドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞に特異的に発現すると考えられた(図4及び5)

。Lrp4は胎生期から成人期にかけての心臓に発現しており、血圧調整ホルモンである心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)の切断を行うと考えられているII型膜貫通プロテアーゼである。ANPは前駆型であるpro-ANPの状態が発現し、細胞外に分泌された後にLrp4より細胞膜表面上で切断され、活性型のANPが生成すると考えられている。これまで、増殖中のドーパミン産生ニューロン前駆細胞で特異的に発現する膜蛋白質をコードする遺伝子は報告されておらず、細胞膜表面に発現するLrp4蛋白質に対する抗体は、Lrp4発現細胞の分離に非常に効果的であると考えられる。抗Lrp4抗体を用いて、中脳腹側領域またはin vitroで分化誘導したドーパミン産生ニューロンを含む培養細胞から、Lrp4発現細胞を分離することで、純粋なドーパミン産生ニューロン前駆細胞を得ることができる(図6)。

【0010】

該前駆細胞をそのまま、またはin vitroで増殖させた後に移植することも可能であり、脳内の最適な場所で分化成熟していく可能性やin vivoでさらに前駆細胞が増殖する可能性もあり、この場合長期的な治療効果も期待できる。また、Lrp4発現細胞をin vitroで分化、成熟させた後に移植を行えば、in vivoで何らかの理由でドーパミン産生ニューロンへの分化が行われない場合にも、治療効果が期待できる。腫瘍化等の危険性を考慮すれば、in vitroで増殖させたLrp4発現細胞を分化誘導した後に、65B13等の分裂停止後のニューロンのマーカーを用いて分離した細胞を用いて移植を行えば安全性も高くなると期待される。いずれの方法でもLrp4発現細胞を分離して移植治療に用いることで、目的の細胞種のみを分離しているので安全性が高く、また、最も初期の前駆細胞を用いることができるため、生存率やネットワーク形成能等の面でも高い治療効果が期待される。もし、分離直後の初期の前駆細胞で最高の治療効果を得られないとしても、分離後にin vitroで培養する等して成熟させることで、最適な分化段階の材料を調製することも可能である(図6)。

【0011】

一方、純粋なドーパミン産生ニューロン前駆細胞を得ることは、ドーパミン産生ニューロンに特異的な遺伝子の単離等、パーキンソン病治療のターゲット探索にも有効である。特に増殖前駆細胞を得られるということは、ドーパミン産生ニ

ユーロンの成熟過程の研究や、成熟を指標にしたスクリーニング系だけでなく、前駆細胞をin vitroまたはin vivoで増殖させる薬剤のスクリーニングや、in vivoで前駆細胞から分化を誘導する薬剤(in vivoでの再生治療薬剤)のスクリーニング等にも有用である。

【0012】

より具体的には、本発明は

[1] 以下の(1)～(5)の塩基配列から選択される配列を含むドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞マーカーポリヌクレオチドプローブ、

(1)配列番号:1または2の塩基配列に相補的な塩基配列

(2)配列番号:3または4記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列に相補的な塩基配列

(3)配列番号:3または4記載のアミノ酸配列において膜貫通領域を欠く配列をコードする塩基配列に相補的な塩基配列

(4) 配列番号:1または2の塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジентな条件下でハイブリダイズする塩基配列

(5)上記(1)～(4)の配列中の少なくとも連続した15塩基を含む塩基配列

[2] 以下の(1)～(6)から選択されるポリペプチドに対する抗体、

(1)配列番号:1または2の塩基配列によりコードされるポリペプチド

(2)配列番号:3または4記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド

(3)配列番号:3または4記載のアミノ酸配列において膜貫通領域を欠くアミノ酸配列からなるポリペプチド

(4)配列番号:3または4記載のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド

(5) 配列番号:1または2の塩基配列に相補的な配列に対してストリンジентな条件下でハイブリダイズする塩基配列によりコードされるポリペプチド

(6)上記(1)～(5)のポリペプチドの断片であり、少なくとも8アミノ酸残基を有するポリペプチド

[3] ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択する方法であって、上記[1]記載のポリヌクレオチドとドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含むと考えられ

る細胞試料とを接触させる工程を含む方法、

[4] ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択する方法であって、上記[2]記載の抗体とドーパミン産生ニューロン前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接触させる工程を含む方法、

[5] 以下の工程を含むドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択する方法、

(1) 上記[3]または[4]記載のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択する方法によりドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択する工程

(2) 上記(1)において選択された前駆細胞を培養する工程

(3) 上記(2)において培養された前駆細胞を、分裂停止後のニューロンマーカーを用いてスクリーニングする工程

[6] 上記[3]～[5]記載の方法により選択された分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞、

[7] ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的遺伝子及び前駆細胞からドーパミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離方法であって、上記[6]記載の前駆細胞または該前駆細胞から分化、誘導若しくは増殖された細胞を用い、該細胞において特異的に発現している遺伝子を検出、単離する工程を含む方法、並びに

[8] 成熟を指標としたスクリーニング方法であり、上記[6]記載の前駆細胞に対し、被験物質を接触させる工程、及び接触による前駆細胞の分化または増殖を検出する工程を含む方法、
に関する。

【0013】

【発明の実施の形態】

<マーカーポリヌクレオチドプローブ>

本発明のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞マーカーポリヌクレオチドプローブは、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択及び/または検出するマーカーとして使用されるものである。該ポリヌクレオチドは、分裂停止前のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に発現するLrp4ポリペプチドをコードする配列番号

:1または2の塩基配列に相補的な塩基配列を含むものである。配列番号:1はマウスLrp4 cDNAの塩基配列、そして配列番号:2はヒトLrp4 cDNAの塩基配列であり、それぞれGenBankに登録された配列である。

【0014】

ここで、「マーカーポリヌクレオチドプローブ」とは、Lrp4 mRNAを検出することができればよく、複数のデオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)等の塩基または塩基対からなる重合体を指す。二本鎖cDNAも組織in situハイブリダイゼーションでプローブとして利用可能であることが知られており、本発明のマーカーにはそのような二本鎖cDNAも含まれる。組織中のRNAの検出において特に好ましいプローブとなるマーカーポリヌクレオチドプローブとしては、RNAプローブ(リボプローブ)を挙げることができる。また、本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブは、天然以外の塩基、例えば、4-アセチルシチジン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン、2'-O-メチルシチジン、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン、ジヒドロウリジン、2'-O-メチルプソイドウリジン、 β -D-ガラクトシルキューエオシン、2'-O-メチルグアノシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデノシン、1-メチルアデノシン、1-メチルプソイドウリジン、1-メチルグアノシン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアノシン、2-メチルアデノシン、2-メチルグアノシン、3-メチルシチジン、5-メチルシチジン、N6-メチルアデノシン、7-メチルグアノシン、5-メチルアミノメチルウリジン、5-メトキシアミノメチル-2-チオウリジン、 β -D-マンノシルキューエオシン、5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン、5-メトキシカルボニルメチルウリジン、5-メトキシウリジン、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデノシン、N-((9- β -D-リボフラノシル-2-メチルリオプリン-6-イル)カルバモイル)トレオニン、N-((9- β -D-リボフラノシルプリン-6-イル)N-メチルカルバモイル)トレオニン、ウリジン-5-オキシ酢酸-メチルエステル、ウリジン-5-オキシ酢酸、ワイプトキソシン、プソイドウリジン、キューエオシン、2-チオシチジン、5-メチル-2-チオウリジン、2-チオウリジン、4-チオウリジン、5-メチルウリジン、N-((9- β -D-リボフラノシルプリン-6-イル)カルバモイル)トレオニン、2'-O-メチル-5-メチルウリジン、2'-O-メチルウリジン、ワイ

プトシン、3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウリジン等を必要に応じて含んでいてもよい。

【0015】

さらに、本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブは、分裂停止前のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に特異的に発現するLrp4ポリペプチドをコードする配列番号:3または4記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列に相補的な塩基配列を含む。配列番号:3または4記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列は、配列番号:1または2に記載された塩基配列に加えて、遺伝子暗号の縮重により配列番号:1または2記載の配列とは異なる塩基配列を含むものである。本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブはまた、配列番号:3または4記載のアミノ酸配列において、膜貫通領域を欠く配列をコードする塩基配列に対して相補的な配列を含むものを包含する。配列番号:3または4記載のアミノ酸配列中、シグナル配列は存在せず、マウスLrp4(配列番号:3)では113-135 アミノ酸残基、ヒトLrp4(配列番号:4)では46-68アミノ酸残基の部分が膜貫通領域を形成している。なお、配列番号:3及び4に記載の配列も各々GenBankに登録されている。

【0016】

ここで、或る「塩基配列に対して相補的」とは、塩基配列が鋳型に対して完全に対になっている場合のみならず、そのうちの少なくとも70%、好ましくは80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上(例えば、97%または99%)が対になっているものも含む。対になっているとは、鋳型となるポリヌクレオチドの塩基配列中のAに対しT(RNAの場合はU)、TまたはUに対しA、Cに対しG、そしてGに対しCが対応して鎖が形成されていることを意味する。そして或るポリヌクレオチド同士の塩基配列レベルでの相同性は、BLASTアルゴリズム(Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-8; Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-7)によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいた塩基配列についてのプログラムとして、BLASTN(Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10)等が開発されており、マーカーポリヌクレオチドプローブの配列の相同性を決定するのに使用することができる。具体的な解析方法については、例えば、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>等を参照する

ことができる。

【0017】

さらに、本発明のマーカージョリヌクレオチドプローブには、分裂停止前のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に特異的に発現するLrp4ポリペプチドをコードする、配列番号:1または2の塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含むポリヌクレオチドが包含される。Lrp4については配列番号:1または2で示される塩基配列を有するものが公知であるが、そのアルタナティブアイソフォーム、及びアレリック変異体が存在する可能性があり、そのようなアイソフォームやアレリック変異体に相補的な配列を有するものも本発明のマーカージョリペプチドとして利用することができる。このようなアイソフォーム及びアレリック変異体は、配列番号:1または2の塩基配列を含むポリヌクレオチドをプローブとして、コロニーハイブリダイゼーション、プラークハイブリダイゼーション、サザンブロット等の公知のハイブリダイゼーション法により、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、ニワトリ、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ等の動物のcDNAライブラリー及びゲノムライブラリーから得ることができる。cDNAライブラリーの作成方法については、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.』(Cold Spring Harbor Press (1989))を参照することができる。また、市販のcDNAライブラリー及びゲノムライブラリーを用いてもよい。

【0018】

より具体的に、cDNAライブラリーの作製においては、まず、Lrp4を発現する細胞、臓器、組織等からグアニジン超遠心法(Chirwin et al. (1979) Biochemistry 18: 5294-9)、AGPC法(Chomczynski and Sacchi (1987) Anal. Biochem. 162: 156-9)等の公知の手法により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit(Pharmacia)等を用いてmRNAを精製する。QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia)のような、直接mRNAを調製するためのキットを利用してもよい。次に得られたmRNAから逆転写酵素を用いてcDNAを合成する。AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit(生化学工業)のようなcDNA合成のためのキットも市販されている。その他の方法として、cDNAはPCRを利用した5' -RACE法(Frohman et

al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8998-9002; Belyavsky et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17: 2919-32)により合成、及び増幅させてもよい。また、全長率の高いcDNAライブラリーを作製するために、オリゴキャップ法(Maruyama and Sugano (1994) Gene 138: 171-4; Suzuki (1997) Gene 200: 149-56)等の公知の手法を採用することもできる。上述のようにして得られたcDNAは、適当なベクター中に組み込む。

【0019】

本発明におけるハイブリダイゼーション条件としては、例えば「2×SSC、0.1%SDS、50℃」、「2×SSC、0.1%SDS、42℃」、「1×SSC、0.1%SDS、37℃」、よりストリンジェントな条件としては、例えば「2×SSC、0.1%SDS、65℃」、「0.5×SSC、0.1%SDS、42℃」、「0.2×SSC、0.1%SDS、65℃」等の条件を挙げることができる。より詳細には、Rapid-hyb buffer(Amersham Life Science)を用いた方法として、68℃で30分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、プローブを添加して1時間以上68℃に保ってハイブリッド形成させ、その後、2×SSC、0.1%SDS中、室温で20分の洗浄を3回、1×SSC、0.1%SDS中、37℃で20分の洗浄を3回、最後に、1×SSC、0.1%SDS中、50℃で20分の洗浄を2回行うことも考えられる。その他、例えばExpresshyb Hybridization Solution (CLONTECH)中、55℃で30分以上プレハイブリダイゼーションを行い、標識プローブを添加し、37～55℃で1時間以上インキュベートし、2×SSC、0.1%SDS中、室温で20分の洗浄を3回、1×SSC、0.1%SDS中、37℃で20分の洗浄を1回行うこともできる。ここで、例えば、プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーションや2度目の洗浄の際の温度を上げることにより、よりストリンジェントな条件とすることができる。例えば、プレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションの温度を60℃、さらにストリンジェントな条件としては68℃とすることができる。当業者であれば、このようなバッファーの塩濃度、温度等の条件に加えて、その他のプローブ濃度、プローブの長さ、反応時間等の諸条件を加味し、Lrp4のアイソフォーム、アレリック変異体、及び対応する他種生物由来の遺伝子を得るための条件を設定することができる。

【0020】

ハイブリダイゼーション法の詳細な手順については、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.』(Cold Spring Harbor Press (1989);特にSection 9.47-9.58)、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987-1997);特にSection 6.3-6.4)、『DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach 2nd ed.』(Oxford University (1995);条件については特にSection 2.10)等を参照することができる。ハイブリダイズするポリヌクレオチドとしては、配列番号:1または2の塩基を含む塩基配列に対して少なくとも50%以上、好ましくは70%、さらに好ましくは80%、より一層好ましくは90%(例えば、95%以上、さらには99%)の同一性を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。このような同一性は、上述の相同性の決定と同様にBLASTアルゴリズム(Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-8; Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-7)によって決定することができる。上述の塩基配列についてのプログラムBLASTNの他に、このアルゴリズムに基づいたアミノ酸配列についての同一性を決定するプログラムとしてBLASTX(Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10)等が開発されており、利用可能である。具体的な解析方法については先に挙げたように、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>等を参照することができる。

【0021】

その他、遺伝子増幅技術(PCR)(Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 6.1-6.4)により、Lrp4のアイソフォームやアレリック変異体等、Lrp4と類似した構造及び機能を有する遺伝子を、配列番号:1または2に記載の塩基配列を基にプライマーを設計し、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、ニワトリ、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ等の動物のcDNAライブラリー及びゲノムライブラリーから得ることができる。

【0022】

ポリヌクレオチドの塩基配列の確認は、慣用の方法により配列決定することにより行うことができる。例えば、ジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法(Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463)等により行うことができる。また、適当なDNAシーケンサーを利用して配列を解析する

ことも可能である。

【0023】

さらに、本発明のマーカポリヌクレオチドプローブには、上記(1) 配列番号:1または2の塩基配列に相補的な配列、(2)配列番号:3または4記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列に相補的な配列、(3)配列番号:3または4記載のアミノ酸配列において膜貫通領域部分を欠く配列をコードする塩基配列に相補的な配列、及び(4)配列番号:1または2の塩基配列からなるポリヌクレオチドに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列の各塩基配列中の少なくとも連続した15塩基を含む塩基配列からなるポリヌクレオチドが含まれる。

【0024】

このような少なくとも連続した15塩基を含む塩基配列からなるポリヌクレオチドは、Lrp4 mRNAの発現を検出するためのプローブ、増幅して検出を行うためのプライマーとして利用することができる。通常、プローブとして使用する場合には15~100、好ましくは15~35個の塩基より構成されていることが望ましく、プライマーとして使用する場合には、少なくとも15、好ましくは30個の塩基より構成されていることが望ましい。プライマーの場合には、3' 末端側の領域を標的とする配列に対して相補的な配列に、5' 末端側には制限酵素認識配列、タグ等を付加した形態に設計することができる。このような少なくとも連続した15塩基を含む塩基配列からなるポリヌクレオチドは、Lrp4ポリヌクレオチドに対してハイブリダイズすることができる。

【0025】

本発明のマーカポリヌクレオチドプローブは、Lrp4を発現する細胞より上述のハイブリダイゼーション法、PCR法等により調製することができる。また、Lrp4の公知の配列情報に基づいて、本発明のマーカポリヌクレオチドプローブは化学合成により製造することもできる。特に組織中のRNAの検出に好ましいとされるリボプローブは、例えば、プラスミドベクターpSP64にクローニングしたLrp4遺伝子またはその一部を逆方向に挿入し、挿入した配列部分をランオフ転写することにより得ることができる。pSP64はSP6プロモーターを含むものであるが、その他、ファージT3、T7プロモーター及びRNAポリメラーゼを組み合わせてリボ

プローブを作成する方法も公知である。

【0026】

<抗体>

本発明により、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞を脳組織、または培養細胞より選択するために利用することができる抗体が提供される。本発明の抗体にはポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体(scFv) (Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-83; The Pharmacology of Monoclonal Antibody, vol.113, Rosenberg and Moore ed., Springer Verlag (1994) pp.269-315)、ヒト化抗体、多特異性抗体(LeDoussal et al. (1992) Int. J. Cancer Suppl. 7: 58-62; Paulus (1985) Behring Inst. Mitt. 78: 118-32; Millstein and Cuello (1983) Nature 305: 537-9; Zimmermann (1986) Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 105: 176-260; Van Dijk et al. (1989) Int. J. Cancer 43: 944-9)、並びに、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fc、Fv等の抗体断片が含まれる。さらに、本発明の抗体は必要に応じ、PEG等により修飾されていてもよい。その他、本発明の抗体は、 β -ガラクトシダーゼ、マルトース結合蛋白質、GST、緑色蛍光蛋白質(GFP)等との融合蛋白質として製造され得、二次抗体を用いずに検出できるようにしてもよい。また、ビオチン等により抗体を標識することによりアビジン、ストレプトアビジン等を用いて抗体の回収を行い得るように改変されていてもよい。

【0027】

本発明の抗体は、(1)配列番号:1または2の塩基配列によりコードされるポリペプチド、(2)配列番号:3または4記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、(3)配列番号:3または4記載のアミノ酸配列において膜貫通領域を欠くアミノ酸配列からなるポリペプチド、(4)配列番号:3または4記載のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド、(5)配列番号:1または2の塩基配列に相補的な配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列によりコードされるポリペプチド、並びに(6)前記(1)~(5)のポリペプチドの断片であり、少なくとも8アミノ酸残基を有するポリペプチドのいずれかに対して特異的な抗体である。

【0028】

本発明の抗体は、Lrp4ポリペプチド若しくはその断片、またはそれらを発現する細胞を感作抗原として製造することができる。また、Lrp4ポリペプチドの短い断片はウシ血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン、卵白アルブミン等のキャリアに結合して免疫原として用いてもよい。また、Lrp4のポリペプチドまたはその断片と共に、アルミニウムアジュバント、完全(または不完全)フロイントアジュバント、百日咳菌アジュバント等の公知のアジュバントを抗原に対する免疫応答を強化するために用いてもよい。

【0029】

本発明における「Lrp4ポリペプチド」はペプチド重合体であり、配列番号:3または4記載のアミノ酸配列を有する蛋白質を好ましい例として挙げることができる。Lrp4ポリペプチドを構成するアミノ酸残基は天然に存在するものでも、また修飾されたものであっても良い。さらに、Lrp4ポリペプチドには膜貫通領域部分を欠く蛋白質、及びその他のペプチド配列により修飾された融合蛋白質が含まれる。

【0030】

本発明において、Lrp4ポリペプチドは、Lrp4ポリペプチドの抗原性を有すればよく、配列番号:3または4のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドを包含する。1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列からなる変異ポリペプチドで、元のポリペプチドと同じ生物学的活性が維持されることは公知である(Mark et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5662-6; Zoller and Smith (1982) Nucleic Acids Res. 10: 6487-500; Wang et al. (1984) Science 224: 1431-3; Dalbadie-McFarland et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6409-13)。そして、このような配列番号:3または4のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列を有するLrp4の抗原性を維持したポリペプチドは、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを公知の『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.』(Cold Spring Harbor Press (1989))、『Current Pro

ocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987-1997);特にSection 8.1-8.5)、Hashimoto-Goto et al. (1995) Gene 152: 271-5、Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-92、Kramer and Fritz (1987) Method. Enzymol. 154: 350-67、Kunkel (1988) Method. Enzymol. 85: 2763-6等に記載の部位特異的変異誘発法等の方法に従って調製し、適宜発現させることにより得ることができる。

【0031】

Lrp4ポリペプチドの断片は、上記Lrp4ポリペプチドの一部と同一であり、少なくとも8アミノ酸残基以上(例えば、8、10、12、または15アミノ酸残基以上)からなるポリペプチド断片である。特に好ましい断片としては、アミノ末端、カルボキシル末端、膜貫通ドメインを欠失したポリペプチド断片を挙げることができる。 α ヘリックス及び α ヘリックス形成領域、 α 両親媒性領域、 β シート及び β シート形成領域、 β 両親媒性領域、基質結合領域、高抗原指数領域、コイル及びコイル形成領域、親水性領域、疎水性領域、ターン及びターン形成領域、並びに表面形成領域を含む断片がLrp4のポリペプチド断片に含まれる。本発明におけるLrp4のポリペプチド断片は、Lrp4ポリペプチドの抗原性さえ有すればどのような断片であってもよい。ポリペプチドの抗原決定部位は、蛋白質のアミノ酸配列上の疎水性／親水性を解析する方法(Kyte-Doolittle (1982) J. Mol. Biol. 157: 105-22)、二次構造を解析する方法(Chou-Fasman (1978) Ann. Rev. Biochem 47: 251-76)により推定し、さらにコンピュータープログラム(Anal. Biochem. 151: 540-6 (1985))、または短いペプチドを合成しその抗原性を確認するPEPSCAN法(特表昭60-500684号公報)等により確認することができる。

【0032】

Lrp4ポリペプチド、及びポリペプチド断片は、Lrp4を発現する細胞・組織等よりその物理的性質等に基づいて単離することもできるし、また公知の遺伝子組換え技術により、また化学的な合成法により製造することもできる。例えば、Lrp4ポリペプチドをin vitroで製造する場合、in vitroトランスレーション(Dasso and Jackson (1989) Nucleic Acids Res. 17: 3129-44)等の方法に従って、細胞を含まない試験管内の系でポリペプチドを製造することができる。それに対して

、細胞を用いてポリペプチドを製造する場合、まず所望のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを適当なベクターに組み込み、適当な宿主細胞を選択し、該ベクターによる形質転換を行い、形質転換された細胞を培養することにより所望のポリペプチドを得ることができる。

【0033】

適当なベクターとして、プラスミド、コスミド、ウイルス、バクテリオファージ、クローニング用ベクター、発現ベクター等の種々のベクターを挙げることができる(Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1989); Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987))。ベクターは、導入された宿主細胞内で所望のポリヌクレオチドが発現されるように制御配列を有し、ポリヌクレオチドは該制御配列下に結合される。ここで「制御配列」とは、宿主細胞が原核生物であればプロモーター、リボソーム結合部位、及びターミネーターを含み、真核生物の場合は、プロモーター及びターミネーターであり、場合によってトランスアクチベーター、転写因子、転写物を安定化するポリAシグナル、スプライシング及びポリアダニル化シグナル等が含まれる。このような制御配列は、それに連結されたポリヌクレオチドの発現に必要とされるすべての構成成分を含むものである。ベクターは、選択可能なマーカーを含んでいてもよい。さらに、細胞内で発現されたポリペプチドを小胞体内腔、グラム陰性菌を宿主とする場合ペリプラズム内、または細胞外へと移行させるために必要とされるシグナルペプチドを目的のポリペプチドに付加するようにして発現ベクターへ組み込むこともできる。このようなシグナルペプチドとして、異種蛋白質由来のシグナルペプチドを利用することができる。さらに、必要に応じリンカーの付加、開始コドン(ATG)、終止コドン(TAA、TAGまたはTGA)の挿入を行ってもよい。

【0034】

in vitroにおけるポリペプチドの発現を可能にするベクターとしては、pBEST(Promega)を例示することができる。また、原核細胞宿主における発現に適した種々のベクターが公知であり(『微生物学基礎講座8 遺伝子工学』(共立出版)等参照)、原核細胞を宿主として選択した場合、当業者であれば選択した宿主に適し

たベクター、ベクターの宿主への導入方法を適宜選ぶことができる。その他、酵母等の真菌類、高等植物、昆虫、魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳類、種々の培養系細胞(COS、Hela、C127、3T3、BHK、HEK293、Bowesメラノーマ細胞)、ミエローマ、Vero、Namalwa、Namalwa KJM-1、HBT5637(特開昭63-299号公報)等)もLrp4ポリペプチド及びその抗原性断片を発現させる宿主として利用することができ、各細胞に適したベクター系、ベクターの宿主細胞への導入手法も公知である。さらに、動物の生体内 (Susumu (1985) Nature 315: 592-4; Lubon (1998) Biotechnol. Annu. Rev. 4: 1-54等参照)、及び植物体において外来蛋白質を発現させる方法も公知でありLrp4ポリヌクレオチドを発現させるために利用することができる。

【0035】

ベクターへのDNAの挿入は、制限酵素サイトを利用したリガーゼ反応により行うことができる(Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 11.4-11.11; Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1989) Section 5.61-5.63)。また必要に応じ、使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、発現効率の高い塩基配列を選択し、Lrp4ポリペプチドコード発現ベクターを設計することができる(Grantham et al. (1981) Nucleic Acids Res. 9: r43-74)。Lrp4ポリペプチドを産生する宿主は、Lrp4ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを細胞内に含むものであるが、該ポリヌクレオチドは、宿主細胞のゲノム上の天然に存在する位置になればよく、該ポリヌクレオチド自身のプロモーター支配下にあっても、ゲノム中に組み込まれていても、染色体外の構造として保持されていても良い。

【0036】

宿主細胞の培養は、選択した細胞に適した公知の方法により行う。例えば、動物細胞を選択した場合には、DMEM(Virology 8: 396 (1959)、MEM(Science 122: 501 (1952))、RPMI1640(J. Am. Med. Assoc. 199: 519 (1967))、199(Proc. Soc. Biol. Med. 73: 1 (1950))、IMDM等の培地を用い、必要に応じウシ胎児血清(FCS)等の血清を添加し、pH約6~8、30~40℃において15~200時間前後の培養を行うことができる。その他、必要に応じ途中で培地の交換を行ったり、通気及び攪

拌を行ったりすることができる。

【0037】

通常、遺伝子組換え技術により製造されたLrp4ポリペプチドは、まず、ポリペプチドが細胞外に分泌される場合には培地を、特にトランスジェニック生物の場合には体液等を、細胞内に産生される場合には細胞を溶解して溶解物を回収する。そして、蛋白質の精製方法として公知の塩析、蒸留、各種クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、ゲル濾過、限外濾過、再結晶、酸抽出、透析、免疫沈降、溶媒沈澱、溶媒抽出、硫酸またはエタノール沈澱等を適宜組合せることにより所望のポリペプチドを精製する。クロマトグラフィーとしては、アニオンまたはカチオン交換等のイオン交換、アフィニティー、逆相、吸着、ゲル濾過、疎水性、ヒドロキシアパタイト、ホスホセルロース、レクチンクロマトグラフィー等が公知である(Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Marshak et al. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996))。HPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。また、例えば、GSTとの融合蛋白質とした場合にはグルタチオンカラムを、ヒスチジンタグを付加した融合蛋白質とした場合にはニッケルカラムを用いた精製法も利用できる。Lrp4ポリペプチドを融合蛋白質として製造した場合には、必要に応じて精製後にトロンビンまたはファクターXa等を使用して不要な部分を切断することもできる。

【0038】

また、天然由来のポリペプチドを精製して取得してもよい。例えば、Lrp4ポリペプチドに対する抗体を利用して、アフィニティークロマトグラフィーにより精製することもできる(Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 16.1-16.19)。さらに、精製したポリペプチドを必要に応じてキモトリプシン、グルコシダーゼ、トリプシン、プロテインキナーゼ、リシルエンドペプチダーゼ等の酵素を用い得られたポリペプチドを修飾することも可能である。一方、Lrp4のポリペプチド断片は、上述のLrp4ポリペプチドと同じような合成及び遺伝子工学的な手法に加えて、ペプチダーゼのような適当な酵素を用いてLrp4ポリペプチドを切断して製造することもできる。

【0039】

ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択するためのポリクローナル抗体は、例えば、上述のようにして精製されたLrp4のポリペプチドまたはその断片を所望によりアジュバントと共に哺乳動物に免疫し、免疫した動物より血清を得る。ここで用いる哺乳動物は、特に限定されないが、ゲッ歯目、ウサギ目、霊長目の動物が一般的である。マウス、ラット、ハムスター等のゲッ歯目、ウサギ等のウサギ目、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等のサル等の霊長目の動物が挙げられる。動物の免疫化は、感作抗原をPhosphate-Buffered Saline(PBS)または生理食塩水等で適宜希釈、懸濁し、必要に応じアジュバントを混合して乳化した後、動物の腹腔内または皮下に注射して行われる。その後、好ましくは、フロイント不完全アジュバントに混合した感作抗原を4~21日毎に数回投与する。抗体の産生は、血清中の所望の抗体レベルを慣用の方法により測定することにより確認することができる。最終的に、血清そのものをポリクローナル抗体として用いても良いし、さらに精製して用いてもよい。具体的な方法として、例えば、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987) Section 11.12-11.13)を参照することができる。

【0040】

また、モノクローナル抗体を産生するためには、まず、上述のようにして免疫化した動物より脾臓を摘出し、該脾臓より免疫細胞を分離し、適当なミエローマ細胞とポリエチレングリコール(PEG)等を用いて融合してハイブリドーマを作成する。細胞の融合は、Milsteinの方法(Galfre and Milstein (1981) Methods Enzymol. 73: 3-46)に準じて行うことができる。ここで、適当なミエローマ細胞として特に、融合細胞を薬剤により選択することを可能にする細胞を挙げられる。このようなミエローマを用いた場合、融合されたハイブリドーマは、融合された細胞以外は死滅するヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む培養液(HAT培養液)で培養して選択する。次に、作成されたハイブリドーマの中から、本発明のポリペプチドまたはその断片に対して結合する抗体を産生するクローンを選択する。その後、選択したクローンをマウス等の腹腔内に移植し、腹水を回収してモノクローナル抗体を得る。また、具体的な方法として、『Current Prot

ocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987) Section 11.4-11.11)を参照することもできる。

【0041】

ハイブリドーマは、その他、最初にEBウイルスに感染させたヒトリンパ球をin vitroで免疫原を用いて感作し、感作リンパ球をヒト由来のミエローマ細胞(U266等)と融合し、ヒト抗体を産生するハイブリドーマを得る方法(特開昭63-17688号公報)によっても得ることができる。また、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物を感作して製造した抗体産生細胞を用いても、ヒト抗体を得ることができる(W092/03918; W093-02227; W094/02602; W094/25585; W096/33735; W096/34096; Mendez et al. (1997) Nat. Genet. 15: 146-56等)。ハイブリドーマを用いない例としては、抗体を産生するリンパ球等の免疫細胞に癌遺伝子を導入して不死化する方法が挙げられる。

【0042】

また、遺伝子組換え技術により抗体を製造することもできる(Borrebaeck and Larrick (1990) Therapeutic Monoclonal Antibodies, MacMillan Publishers LTD., UK参照)。そのためには、まず、抗体をコードする遺伝子をハイブリドーマまたは抗体産生細胞(感作リンパ球等)からクローニングする。得られた遺伝子を適当なベクターに組み込み、宿主に該ベクターを導入し、宿主を培養することにより抗体を産生させる。このような組換え型の抗体も本発明の抗体に含まれる。代表的な組換え型の抗体として、非ヒト抗体由来可変領域及びヒト抗体由来定常領域とからなるキメラ抗体、並びに非ヒト抗体由来相補性決定領域(CDR)、及び、ヒト抗体由来フレームワーク領域(FR)及び定常領域とからなるヒト化抗体が挙げられる(Jones et al. (1986) Nature 321: 522-5; Reichmann et al. (1988) Nature 332: 323-9; Presta (1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-6; Methods Enzymol. 203: 99-121 (1991))。

【0043】

抗体断片は、上述のポリクローナルまたはモノクローナル抗体をパパイン、ペプシン等の酵素で処理することにより製造し得る。または、抗体断片をコードする遺伝子を用いて遺伝子工学的に製造することも可能である(Co et al., (1994)

J. Immunol. 152: 2968-76; Better and Hörwitz (1989) Methods Enzymol. 178: 476-96; Pluckthun and Skerra (1989) Methods Enzymol. 178: 497-515; Lamoyi (1986) Methods Enzymol. 121: 652-63; Rousseaux et al. (1986) 121: 663-9; Bird and Walker (1991) Trends Biotechnol. 9: 132-7参照)。

【 0 0 4 4 】

多特異性抗体には、二特異性抗体(BsAb)、ダイアボディ(Db)等が含まれる。多特異性抗体は、(1)異なる特異性の抗体を異種二機能性リンカーにより化学的にカップリングする方法(Paulus (1985) Behring Inst. Mill. 78: 118-32)、(2)異なるモノクローナル交代を分泌するハイブリドーマを融合する方法(Millstein and Cuello (1983) Nature 305: 537-9)、(3)異なるモノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖遺伝子(4種のDNA)によりマウス骨髓腫細胞等の真核細胞発現系をトランスフェクションした後、二特異性の一価部分を単離する方法(Zimmermann (1986) Rev. Physio. Biochem. Pharmacol. 105: 176-260; Van Dijk et al. (1989) Int. J. Cancer 43: 944-9)等により作製することができる。一方、Dbは遺伝子融合により構築され得る二価の2本のポリペプチド鎖から構成されるダイマーの抗体断片であり、公知の手法により作製することができる(Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-8; EP404097; W093/11161参照)。

【 0 0 4 5 】

抗体及び抗体断片の回収及び精製は、プロテインA及びGを用いて行う他、抗体以外のポリペプチドの製造の場合と同様に上記した蛋白質精製技術によっても行い得る(Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988))。例えば、本発明の抗体の精製にプロテインAを利用する場合、Hyper D、POROS、Sephacrose F.F. (Pharmacia)等のプロテインAカラムが公知であり、使用可能である。得られた抗体の濃度は、その吸光度を測定することにより、または酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)等により決定することができる。

【 0 0 4 6 】

抗体の抗原結合活性は、吸光度測定、蛍光抗体法、酵素免疫測定法(EIA)、放射免疫測定法(RIA)、ELISA等により測定することができる。ELISA法により測定

の場合、本発明の抗体をプレート等の担体に固相化し、次いでLrp4ポリペプチドを添加した後、目的とする抗体を含む試料を添加する。ここで、抗体を含む試料としては、抗体産性細胞の培養上清、精製抗体等が考えられる。続いて、本発明の抗体を認識する二次抗体を添加し、プレートのインキュベーションを行う。その後、プレートを洗浄し、二次抗体に付加された標識を検出する。即ち、二次抗体がアルカリフォスファターゼで標識されている場合には、p-ニトロフェニルリン酸等の酵素基質を添加して吸光度を測定することで、抗原結合活性を測定することができる。また、抗体の活性評価に、BIAcore(Pharmacia)等の市販の系を使用することもできる。

【0047】

<ドーパミン産生ニューロンの選択方法>

本発明により分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択的に均一な集団として選択する方法が提供された。分裂停止前のドーパミン産生ニューロン前駆細胞は、本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブまたは抗体を用いて選択することができる。ここで、「選択」という用語は、或る試料中におけるドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞の存在を検出すること、及び、存在を検出しさらに分離または単離することの両方を含むものである。より具体的には、本発明は、本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブとドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接触させる工程を含むドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択する方法を提供するものである。該方法においては、マーカーポリヌクレオチドプローブを好ましくは放射性同位体または非放射性化合物で標識しておく。例えば、標識するための放射性同位体としては、 ^{35}S 、 ^3H 等を挙げることができる。放射標識したマーカーポリヌクレオチドプローブを用いた場合、エマルションオートラジオグラフィーにより銀粒子を検出することによりマーカーと結合するRNAを検出することができる。また、マーカーポリヌクレオチドプローブ標識のための非放射性同位体としては、ビオチン、ジゴキシゲニン等が例示される。ビオチン標識マーカーの検出は、例えば、蛍光、または、アルカリ性ホスファターゼ若しくは西洋ワサビペルオキシダーゼ等の酵素を標識したアビジンを用いて行うことができる。一方、ジゴキシゲニン標識

マーカーの検出には、蛍光、または、アルカリ性ホスファターゼ若しくは西洋ワサビペルオキシダーゼ等の酵素を標識した抗ジゴキシゲニン抗体を使用することができる。酵素標識を使用する場合には、酵素の基質と共にインキュベートし、安定な色素をマーカー位置に沈着させることで検出を行う。特に蛍光を利用した、in situハイブリッド形成法(FISH)が簡便であり、特に好ましいものである。

【0048】

また、本発明により、本発明のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を選択するための抗体とドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を含むと考えられる細胞試料とを接触させる工程を含むドーパミン産生ニューロンの選択方法が提供される。即ち、ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を含むことが予測される細胞試料と本発明の抗体とを接触させ、抗体に結合する細胞を選択することでLrp4ポリペプチドを発現している細胞、即ち、分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を取得できる(図6参照)。細胞との接触前に、抗体を適当な担体に固定化して用いることも可能である。または、細胞と抗体とを接触させ、結合させた後、抗体のアフィニティーによる精製を行うことで、該抗体と結合した細胞を選択的に回収することもできる。例えば、本発明の抗体がビオチンと結合されている場合には、アビジンやストレプトアビジンを結合したプレートやカラムに対して添加することにより精製を行うことができる。

【0049】

さらに、本発明により、本発明のマーカーポリヌクレオチドプローブまたは抗体を使用して選択されたドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞を培養し、培養した前駆細胞を分裂停止後のニューロンマーカーを用いてスクリーニングすることにより、腫瘍化する危険性の低い移植治療に特に適したドーパミン産生ニューロン前駆細胞を得ることができる。分裂停止後のニューロンマーカーとしては、例えば65B13を挙げることができる。例えば、65BB13ポリペプチドに対する抗体を培養したドーパミン産生ニューロン前駆細胞と接触させて65B13ポリペプチドを発現している細胞を選択することにより分裂停止直後のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を選択することができる。また、65B13はIgドメインを接着分子様の構造を有し、培養細胞中で発現させた場合に65B13を発現させた細胞同士が接

着するのに対し、65B13を発現させていない細胞とは接着しないことから、65B13を介した接着はホモフィリックな結合と考えられているので、65B13ポリペプチドの細胞外領域部分との接着を利用した65B13発現ドーパミン産生ニューロン前駆細胞のスクリーニングも可能である。

【0050】

Lrp4発現ドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞及び65B13発現ドーパミン産生ニューロン前駆細胞の選択及び/またはスクリーニングは、各々Lrp4または65B13に対するプロモーターを利用して行うこともできる(例えば、特開2002-51775号公報参照)。例えば、後述するLrp4の発現領域解析により得られたプロモーター部分に対し、GFP等の検出可能なマーカーをコードする遺伝子を連結した構築物を含むベクターを細胞に対してトランスフェクションすることができる。その他、Lrp4遺伝子座へマーカーをコードする遺伝子をノックインすることができる。どちらの場合にも、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的にマーカー遺伝子の発現が検出されることとなり、特異的な細胞の選択が可能となる。65B13についてもLrp4と同様の方法によりスクリーニングが可能である。65B13については、例えば、特願2002-307573号明細書に記載の配列を参照することができる。

【0051】

ここで使用する細胞試料は好ましくは、中脳腹側領域の細胞、またはin vitroで分化誘導されたドーパミン産生ニューロンを含む培養培地である。in vitroにおけるドーパミン産生ニューロンの分化誘導は、公知のES細胞、骨髄間質細胞、神経由来の不老化セルライン(特表平8-509215号公報; 特表平11-506930号公報; 特表2002-522070号公報)、ニューロン始原細胞(特表平11-509729号公報)等の細胞を出発材料として、公知の方法により行うことができる。通常、ドーパミン産生ニューロンは、脳のドーパミン産生ニューロン領域から得た組織を神経組織由来の支持細胞層と共培養することにより分化させることができる。さらに、線条体及び皮質等の通常非ドーパミン産生神経組織からドーパミン産生細胞を誘導する方法も知られている(特表平10-509319号公報)。また、低酸素条件下での培養により、より多くドーパミン産生ニューロンを含む細胞が得られるとの報告も成されている(特表2002-530068号公報)。本発明のドーパミン産生ニューロン前駆

細胞の選択に用いる細胞試料は、如何なる方法により分離または培養された細胞群であつてもよい。

【0052】

また、本発明の抗体またはポリペプチドを固定する担体としては、細胞に対して無害なものである必要がある。例えば、合成または天然の有機高分子化合物、ガラスビーズ、シリカゲル、アルミナ、活性炭等の無機材料、及びこれらの表面に多糖類、合成高分子等をコーティングしたものが考えられる。担体の形状には特に制限はなく、膜状、繊維状、顆粒状、中空糸状、不織布状、多孔形状、ハニカム形状等が挙げられ、その厚さ、表面積、太さ、長さ、形状、大きさを種々変えることにより接触面積を制御することができる。

【0053】

<ドーパミン産生ニューロン前駆細胞>

このようにしてLrp4の発現を指標として獲得された細胞は、分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞であることから、従来の雑多な細胞集団または外来遺伝子を導入したドーパミン産生ニューロンと比べて、安全性、生存率、ネットワーク形成能の面でPD等の神経変性疾患の移植治療に好ましいものである。Lrp4の発現を指標として獲得された細胞は、そのまま、またはin vitroで増殖させた後に移植に使用することができる(図6)。本発明のLrp4の発現を指標として選択されるドーパミン産生ニューロン前駆細胞は増殖中の前駆細胞であることから、脳内の最適な場所で分化成熟していく可能性、またin vivoにおいてさらに前駆細胞が増殖する可能性があることから、より長期的な治療効果が期待される。さらに、本方法により得られた本発明の細胞(群)は、分裂停止前の前駆細胞であることから、in vitroにおいて培地等の条件を選択することにより適当な段階まで分化させることも可能であり、種々の神経移植治療の材料としても好ましいものである。例えば、前述したように、Lrp4の発現を指標として選択された細胞について、さらに細胞分裂停止直後のマーカー(例えば、65B13)を指標とした選択を行うことにより、より移植の上では安全性の高い細胞を得ることもできる。

【0054】

本発明の方法により得られたニューロン前駆細胞の移植では、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ 個、さらに好ましくは $5 \sim 6 \times 10^4$ 個のニューロンを移植する。第1の方法としては、細胞の懸濁液を脳に移植する定位脳固定術(stereotaxic surgery)が挙げられる。また、ミクロ手術(microsurgery)により細胞を移植しても良い。ニューロン組織の移植方法については、Backlund等(Backlund et al. (1985) J. Neurosurg. 62: 169-73)、Lindvall等(Lindvall et al. (1987) Ann. Neurol. 22: 457-68)、Madrado等(Madrado et al. (1987) New Engl. J. Med. 316: 831-4)の方法を参照することができる。

【0055】

さらに、本発明の細胞は、ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的遺伝子及び前駆細胞からドーパミン産生ニューロンへの各成熟段階に特異的な遺伝子の単離、PD治療のターゲット探索、ドーパミン産生ニューロンの成熟過程の解明、並びに成熟を指標としたスクリーニング等にも利用することができる。

【0056】

<遺伝子発現レベルの比較>

本発明の抗体を用いて得られた分裂停止前のドーパミン産生ニューロン前駆細胞は、該細胞において特異的に発現している遺伝子を単離する材料として使用することができる。さらに、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞を分化、誘導、または増殖させた細胞に特異的に発現している遺伝子を調べ、単離することもできる。また、分化／誘導／増殖させた細胞と元の前駆細胞とにおいて発現レベルに差違のある遺伝子を調べることによりドーパミン産生ニューロンの生体内における分化に必要とされる遺伝子を調べることもできる。このような遺伝子はドーパミン産生ニューロンにおける何等かの欠陥が病因となっている疾病の治療対象候補となり得るので、当該遺伝子を決定し、単離することは非常に有用である。

【0057】

本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞と該細胞から分化／誘導／増殖された細胞若しくはその他の細胞、または該分化／誘導／増殖された細胞とその他の細胞との間での遺伝子の発現レベルの比較は、慣用の細胞in situハイブリダ

イゼーション、ノーザンブロットハイブリダイゼーション、RNAドットブロットハイブリダイゼーション、逆転写PCR、RNase保護アッセイ、DNAマイクロアレイハイブリダイゼーション、遺伝子発現の連続解析(SAGE; serial analysis of gene expression) (Velculescu et al. (1995) Science 270: 484-7)、差し引きハイブリダイゼーション(subtractive hybridization)、代表差違分析(representation difference analysis; RDA) (Lisitsyn (1995) Trends Genet. 11: 303-7)等により行うことができる。

【0058】

細胞in situハイブリダイゼーションでは、特定のRNA配列に特異的な標識プローブを用い細胞から調製した総RNAまたはpolyA⁺RNAに対してハイブリダイゼーションを行うことにより、個々の細胞におけるRNAのプロセッシング、輸送、細胞質への局在化が起こる場所等を調べることができる。また、RNAの大きさをゲル電気泳動等によりサイズ分画して決定することもできる。また、定量的な蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)及びデジタル画像顕微鏡を用いれば、RNA転写産物をin situで視覚的に捉えることも可能であり(Femino et al. (1998) Science 280: 585-90)、本発明において利用することができる。

【0059】

遺伝子発現の解析で逆転写PCRを用いた場合、特定遺伝子の発現を大まかに定量することができる。本方法では、1つのRNA転写産物の種々のアイソフォームを検出及び解析することも可能である。逆転写PCRにおいてはまず、エキソン特異性プライマーを用いた逆転写PCRを行い、予想された産物以外の増幅産物が検出された場合、それらを解析することにより選択的スプライシングにより生じるmRNAアイソフォームを同定することが可能である。例えば、Pykett et al. (1994) Hum. Mol. Genet. 3: 559-64等に記載の方法を参照することができる。特に大まかな発現パターンを迅速に解析することが求められる場合、本発明のPCRを利用した本方法は、その速さ、感度の高さ、簡便さの点からも望ましいものである。

【0060】

DNAチップを使用することにより、遺伝子発現スクリーニングの能率を向上さ

せることができる。ここで、DNAチップとは、ガラス等の担体表面上にオリゴヌクレオチドまたはDNAクローン等を高密度に固定した小型のアレイである。例えば、多重発現スクリーニングを行うためには、各目的遺伝子に対するcDNAクローンまたは該遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドをチップに対して固定化し、マイクロアレイを作製する。次に本発明のドーパミン特異的ニューロン前駆細胞、または該細胞より分化／誘導／増殖された細胞よりRNAを調製し、逆転写酵素処理を行い、cDNAを得る。次に、得られたcDNA試料を蛍光タグ等のタグにより標識し、マイクロアレイに対するハイブリダイゼーションを行う。その結果、総標識cDNA中、細胞内で活発に発現している遺伝子の割合が高くなり、あまり発現されていない遺伝子の割合は低くなる。即ち、標識cDNAとチップ上のcDNAクローンまたはオリゴヌクレオチドとのハイブリッド形成を意味する蛍光シグナルの強度は、標識cDNA内での各配列の発現の度合いを示すこととなり、遺伝子発現の定量を可能成らしめる。

【0061】

また、縮重PCRプライマーを用いた逆転写PCRを行うmRNAディファレンシャルディスプレイにより、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞、または該細胞から分化／誘導／増殖された細胞について多数の遺伝子の発現を同時に解析することもできる。まず、特定のmRNAのpolyA尾部に3'末端の1または2つの塩基を変更した修飾オリゴdTプライマーを準備し、本発明の前駆細胞または該細胞から分化／増殖された細胞、及び、発現を比較する対照細胞から短離した総RNAに対して逆転写酵素反応を行う(Liang et al. (1993) Nucleic Acids Res. 21: 3269-75)。変更した塩基が「G」であれば、polyA尾部の直前にCを持つmRNAを選択的に増幅することができ、また「CA」であれば、TGを直前に持つmRNAを増幅することができる。次に、第2のプライマーとして、10塩基程度の長さの任意の配列を有するものを用意し、修飾オリゴdTプライマー及び第2のプライマーを使用してPCR増幅反応を行う。増幅産物を泳動距離の長いポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、サイズ分画する。このような方法により、本発明の細胞と対照細胞とで各細胞に特異的に発現しているmRNA由来のcDNAは、一方の試料を泳動した場合にのみ検出されるバンドとして検出することができる。この方法では、同定され

ていない遺伝子の発現についても解析することができる。

【0062】

SAGE分析は、多数の転写産物の発現を動じに検出することができ、また検出に特殊な装置を必要としない点で好ましい分析方法の一つである。まず、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞または該細胞から分化／誘導／増殖された細胞よりpolyA⁺RNAを慣用の方法により抽出する。次に、ビオチン化オリゴdTプライマーを用い、前記RNAをcDNAに変換し、4塩基認識制限酵素(アンカー用酵素;AE)で処理する。ここで、AE処理断片は、その3'末端にビオチン基を含んだ形となる。次に、AE処理断片をストレプトアビジンに結合させる、結合されたcDNAを2画分に分け、それぞれの画分を別々お2本鎖オリゴヌクレオチドアダプター(リンカー)A及びBに連結する。このリンカーは、(1)アンカー用酵素の作用で生じる突出部の配列と相補的な配列を有する1本鎖突出部、(2)タグ用酵素(tagging enzyme;TE)となるIIS型制限酵素(認識部位より20bp以下の離れた定位置の切断を行う)の5'塩基認識配列、及び(3)PCR用特異的プライマーを構成するのに十分な追加配列より構成される。ここで、リンカーを連結したcDNAをタグ用酵素で切断することにより、リンカー結合型の状態でcDNA配列部分のみが短鎖配列タグとなる。次に、リンカーの異なる2種類のプールを互いに連結し、リンカーA及びBに特異的プライマーを使用してPCR増幅する。その結果、増幅産物はリンカーA及びBに結合した2つの隣接配列タグ(ダイタグ;ditag)を含む多様な配列の混在物として得られる。そこで、増幅産物をアンカー用酵素により処理し、遊離したダイタグ部分を通常の連結反応により鎖状に連結し、クローニングを行う。クローニングにより得られたクローンの塩基配列を決定することにより、一定長の連続ダイタグの読み出しを得ることができる。このようにしてクローンの塩基配列を決定し、配列タグの情報が得られれば、それぞれのタグに該当するmRNAの存在を同定することができる。

【0063】

差し引きハイブリダイゼーションは、種々の組織または細胞間で発現の差のある遺伝子のクローニングによく用いられる方法であるが、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞、またはそれから分化／誘導／増殖された細胞において

特異的に発現している遺伝子をクローニングするのにも使用することができる。まず、本発明の前記細胞のうちの試験する細胞のDNA試料を調製する(以下、テストDNAと呼ぶ)。次に、比較する細胞のDNA(以下、ドライバーDNAと呼ぶ)を調製する。テストDNAとドライバーDNAとを逆に用いることもできる。いずれにせよ、テストDNAに存在し、ドライバーDNAに存在しない遺伝子の存在が検出される。次に、調製したテストDNA及び大過剰量のドライバーDNAを混合し、変性させ一本鎖DNAとした後にアニーリングさせる。アニーリング条件を調節することにより、ドライバーDNA中には存在しない特異的な配列をテストDNA由来のDNAのみからなる二本鎖DNAとして単離することができる。より詳細な方法については、Swaroop et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19: 1954及びYasunaga et al. (1999) Nature Genet. 21: 363-9等を参照することもできる。

【0064】

RDA法は、PCRを利用した、ドライバーDNAに存在しないテストDNA中の配列を選択的に増幅することを可能とする方法であり、上述のその他の方法と同様に本発明において用いることができる。より詳細な手順については、Lisitsyn (1995) Trends Genet. 11: 303-7及びSchutte et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 5950-4を参照することができる。

【0065】

以上のようにして検出、単離されたドーパミン産生ニューロン前駆細胞、または該細胞を分化、誘導、または増殖させた細胞に特異的な遺伝子を上述の各種公知の方法によりベクター等に挿入し、配列決定、発現解析を行うこともできる。

【0066】

<前駆細胞の成熟を指標としたスクリーニング>

本発明により、本発明のドーパミン産生ニューロン前駆細胞に対し、被験物質を接触させる工程、及び接触による前駆細胞の分化または増殖を検出する工程を含む、スクリーニング方法が提供される。本方法によりスクリーニングされる化合物は、ドーパミン産生ニューロンの分化、増殖等を調節する機能を示すことから、ドーパミン産生ニューロンにおける何等かの欠陥が病因となっている疾病の治療対象候補となり得、有用と考えられる。

【0067】

ここで、「被験物質」とはどのような化合物であってもよいが、例えば、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物ライブラリー、合成ペプチドライブラリー、抗体、細菌放出物質、細胞(微生物、植物細胞、動物細胞)抽出液、細胞(微生物、植物細胞、動物細胞)培養上清、精製または部分精製ポリペプチド、海洋生物、植物または動物等由来の抽出物、土壌、ランダムファージペプチドディスプレイライブラリーが挙げられる。

【0068】

細胞の分化や増殖は、被験物質と接触させない場合における細胞の状態と比較することにより検出することができる。細胞の分化や増殖は、顕微鏡下において形態学的な観察を行うこと、または、細胞で産生されるドーパミン等の物質を検出、定量して検出してもよい。

【0069】

<Lrp4の発現領域解析>

Lrp4の発現制御領域は、Lrp4の遺伝子配列を利用してゲノムDNAから公知の方法によってクローニングすることができる。例えば、S1マッピング法のような転写開始点の特定方法(細胞工学 別冊8 新細胞工学実験プロトコル, 東京大学医科学研究所制癌研究部編, 秀潤社(1993) pp.362-374)が公知であり、利用できる。一般に、遺伝子の発現制御領域は、遺伝子の5'末端の15~100bp、好ましくは30~50bpをプローブDNAとして利用して、ゲノムDNAライブラリーをスクリーニングすることによりクローニングすることができる(本発明においては、配列番号:1または2の塩基全部またはその1部)。このようにして得られるクローンは、10kbp以上の5'非翻訳領域を含むものであるので、次にエキソヌクレアーゼ等により処理し短縮化または断片化する。最後に、短縮された発現制御領域の候補を含む配列部分をレポーター遺伝子を利用して、その発現の有無、強さ、制御等について評価し、Lrp4の発現制御領域の活性維持のための最小必要単位を決定することができる。

【0070】

遺伝子の発現制御領域は、Neural Network等のプログラム(<http://www.fruitf>

ly.org/seq_tools/promoter.html; Reese et al., Biocomputing: Proceedings of the 1996 Pacific Symposium, Hunter and Klein ed., World Scientific Publishing Co., Singapore, (1996))を用いて予測することもできる。さらに、発現制御領域の活性最小単位を予測するプログラム(<http://biosci.cbs.umn.edu./software/proscan/promoterscan.htm>; Prestidge (1995) J. Mol. Biol. 249: 923-32)も公知であり、用いることができる。

【0071】

このようにして短離された、Lrp4遺伝子の発現領域は、in vivoで分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞特異的に所望の蛋白質を産生するのに利用することもできる。

【0072】

<Lrp4に対するリガンド>

Lrp4ポリペプチドは膜貫通ドメインを有することから、天然において細胞膜中に埋め込まれた状態で存在すると考えられる。Lrp4は、分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞で発現されていることから、前駆細胞の増殖制御やニューロンの分化、成熟に関与していることが考えられる。従って、Lrp4に対するアゴニストやアンタゴニスト等の機能を示す可能性があるリガンドは、ドーパミン産生ニューロンのin vivo、ex vivo及びin vitroにおける分化を制御するのに利用できる可能性がある。Lrp4ポリペプチドに対するリガンドの同定においては、まず、Lrp4ポリペプチドと候補化合物とを接触させ、結合の有無を検定する。この際、Lrp4ポリペプチドを担体に固定したり、細胞膜に埋め込まれた状態に発現させて用いることもできる。候補化合物としては特に制限はなく、遺伝子ライブラリーの発現産物、海洋生物由来の天然成分、各種細胞の抽出物、公知化合物及びペプチド、植物由来の天然成分、生体組織抽出物、微生物の培養上清、並びにファージディスプレイ法等によりランダムに製造されたペプチド群(J. Mol. Biol. 222: 301-10 (1991))等が含まれる。また、結合の検出を容易にするために、候補化合物は標識しても良い。

【0073】

<アンチセンス及びリボザイム>

本発明により、Lrp4が分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞で一過性に発現されることが明らかにされたことから、Lrp4が前駆細胞の増殖制御やニューロンの分化、成熟に関与していることが考えられた。従って、Lrp4遺伝子に対するアンチセンス及びリボザイム等は、ドーパミン産生ニューロンの *in vivo*、*ex vivo* 及び *in vitro* における分化を制御するのに利用できる可能性がある。従って、本発明はこのようなアンチセンス及びリボザイムを提供するものである。

【0074】

アンチセンスが標的遺伝子の発現を抑制する機構としては、(1)3重鎖形成による転写開始阻害、(2)RNAポリメラーゼにより形成される局所的開状ループ構造部位とのハイブリッド形成による転写抑制、(3)合成中のRNAとのハイブリッド形成による転写阻害、(4)イントロン-エキソン接合点におけるハイブリッド形成によるスプライシング抑制、(5)スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、(6)mRNAとのハイブリッド形成による、mRNAの細胞質への移行抑制、(7)キャッピング部位またはポリA付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、(8)翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始抑制、(9)リボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、(10)mRNA翻訳領域またはポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるペプチド鎖の伸長抑制、並びに(11)核酸と蛋白質の相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制が挙げられる(平島及び井上『新生化学実験講座2 核酸IV 遺伝子の複製と発現』日本生化学会編、東京化学同人、pp.319-347 (1993))。

【0075】

本発明のLrp4アンチセンス核酸は、上述の(1)～(11)のどの機構により遺伝子発現を抑制する核酸であってもよく、即ち、発現を阻害する目的の遺伝子の翻訳領域のみならず、非翻訳領域の配列に対するアンチセンス配列を含むものであってもよい。アンチセンス核酸をコードするDNAは、その発現を可能とする適当な制御配列下に連結して使用され得る。アンチセンス核酸は、標的とする遺伝子の翻訳領域または非翻訳領域に対して完全に相補的である必要はなく、効果的に該

遺伝子の発現を阻害するものであればよい。このようなアンチセンス核酸としては、少なくとも15bp以上、好ましくは100bp以上、さらに好ましくは500bp以上であり通常3000bp以内、好ましくは2000bp以内、より好ましくは1000bp以内の鎖長を有し、標的遺伝子の転写産物の相補鎖に対して好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上同一である。このようなアンチセンス核酸は、Lrp4ポリヌクレオチドを基に、ホスホロチオネート法(Stein (1988) *Nucleic Acids Res.* 16: 3209-21)等により調製することができる。

【0076】

リボザイムとは、RNAを構成成分とする触媒の総称であり、大きくラージリボザイム(large ribozyme)及びスモールリボザイム(small liboyme)に分類される。ラージリボザイムは、核酸のリン酸エステル結合を切断し、反応後に5'-リン酸と3'-ヒドロキシル基を反応部位に残す酵素である。ラージリボザイムは、さらに(1)グアノシンによる5'-スプライス部位でのトランスエステル化反応を行うグループIイントロンRNA、(2)自己スプライシングをラリアット構造を経る二段階反応で行うグループIIイントロンRNA、及び(3)加水分解反応によるtRNA前駆体を5'側で切断するリボヌクレアーゼPのRNA成分に分類される。それに対して、スモールリボザイムは、比較的小さな構造単位(40bp程度)であり、RNAを切断して、5'-ヒドロキシル基と2'-3'環状リン酸を生じさせる。スモールリボザイムには、ハンマーヘッド型(Koizumi et al. (1988) *FEBS Lett.* 228: 225)、ヘアピン型(Buzayan (1986) *Nature* 323: 349; Kikuchi and Sasaki (1992) *Nucleic Acids Res.* 19: 6751; 菊地洋(1992)化学と生物 30: 112)等のリボザイムが含まれる。リボザイムは、改変及び合成が容易になため多様な改良方法が公知であり、例えば、リボザイムの基質結合部を標的部位の近くのRNA配列と相補的となるように設計することにより、標的RNA中の塩基配列UC、UUまたはUAを認識して切断するハンマーヘッド型リボザイムを作ることができる(Koizumi et al. (1988) *FEBS Lett.* 228: 225; 小泉誠及び大塚栄子(1990)蛋白質核酸酵素35: 2191; Koizumi et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17: 7059)。ヘアピン型のリボザイムについても、公知の方法に従って設計、製造が可能である(Kikuchi and Sasaki (1992) *Nucleic Acids Res.* 19: 6751; 菊地洋(1992)化学と生物 30: 112

)。

【 0 0 7 7 】

本発明のアンチセンス核酸及びリボザイムは、細胞内における遺伝子の発現を制御するために、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等のウイルス由来のベクター、リボソーム等を利用した非ウイルスベクター、またはnaked DNAとしてex vivo法またはin vivo法により遺伝子治療に用いることもできる。

【 0 0 7 8 】

アンチセンスが標的遺伝子の発現抑制作用の機構としては、(1) 3重鎖形成による転写開始阻害、(2) RNAポリメラーゼにより形成される局所的開状ループ構造部位とのハイブリッド形成による転写抑制、(3) 合成中のRNAとのハイブリッド形成による転写阻害、(4) イントロン-エキソン接合点におけるハイブリッド形成によるスプライシング抑制、(5) スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、(6) mRNAとのハイブリッド形成による、mRNAの細胞質への移行抑制、(7) キャッピング部位またはポリA付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、(8) 翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始抑制、(9) リボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、(10) mRNA翻訳領域またはポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるペプチド鎖の伸長抑制、並びに(11) 核酸と蛋白質の相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制が挙げられる(平島及び井上『新生化学実験講座2 核酸IV 遺伝子の複製と発現』日本生化学会編、東京化学同人、pp.319-347 (1993))。

【 0 0 7 9 】

本発明のヌクレオチド鎖に含まれるアンチセンス核酸は、上述の(1)～(11)のどの機構により遺伝子発現を抑制する核酸であってもよく、即ち、発現を阻害する目的の遺伝子の翻訳領域のみならず、非翻訳領域の配列に対するアンチセンス配列を含むものであってもよい。アンチセンス核酸をコードするDNAは、その発現を可能とする適当な制御配列下に連結して使用され得る。アンチセンス核酸は、標的とする遺伝子の翻訳領域または非翻訳領域に対して完全に相補的である必

要はなく、効果的に該遺伝子の発現を阻害するものであればよい。このようなアンチセンス核酸としては、少なくとも15bp以上、好ましくは100bp以上、さらに好ましくは500bp以上であり通常3000bp以内、好ましくは2000bp以内、より好ましくは1000bp以内の鎖長を有し、標的遺伝子の転写産物の相補鎖に対して好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上同一である。このようなアンチセンス核酸は、本発明のポリヌクレオチドを基に、ホスホロチオネート法(Stein (1988) *Nucleic Acids Res.* 16: 3209-21)等により調製することができる。

【0080】

リボザイムとは、RNAを構成成分とする触媒の総称であり、大きくラージリボザイム(large ribozyme)及びスモールリボザイム(small liboyme)に分類される。ラージリボザイムは、核酸のリン酸エステル結合を切断し、反応後に5'-リン酸と3'-ヒドロキシル基を反応部位に残す酵素である。ラージリボザイムは、さらに(1)グアノシンによる5'-スプライス部位でのトランスエステル化反応を行うグループIイントロンRNA、(2)自己スプライシングをラリアット構造を経る二段階反応で行うグループIIイントロンRNA、及び(3)加水分解反応によるtRNA前駆体を5'側で切断するリボヌクレアーゼPのRNA成分に分類される。それに対して、スモールリボザイムは、比較的小さな構造単位(40bp程度)であり、RNAを切断して、5'-ヒドロキシル基と2'-3'環状リン酸を生じさせる。スモールリボザイムには、ハンマーヘッド型(Koizumi et al. (1988) *FEBS Lett.* 228: 225)、ヘアピン型(Buzayan (1986) *Nature* 323: 349; Kikuchi and Sasaki (1992) *Nucleic Acids Res.* 19: 6751; 菊地洋(1992)化学と生物 30: 112)等のリボザイムが含まれる。リボザイムは、改変及び合成が容易になため多様な改良方法が公知であり、例えば、リボザイムの基質結合部を標的部位の近くのRNA配列と相補的となるように設計することにより、標的RNA中の塩基配列UC、UUまたはUAを認識して切断するハンマーヘッド型リボザイムを作ることができる(Koizumi et al. (1988) *FEBS Lett.* 228: 225; 小泉誠及び大塚栄子(1990)蛋白質核酸酵素35: 2191; Koizumi et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17: 7059)。ヘアピン型のリボザイムについても、公知の方法に従って設計、製造が可能である(Kikuchi and Sasaki (1992) *Nucleic Acids Res.* 19: 6751; 菊地洋(1992)化学と生物 30: 112

)。

【0081】

本発明のヌクレオチド鎖に含まれるアンチセンス核酸及びリボザイムは、細胞内における遺伝子の発現を制御するために、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等のウイルス由来のベクター、リボソーム等を利用した非ウイルスベクター、またはnaked DNAとしてex vivo法またはin vivo法により遺伝子治療に用いることもできる。

【0082】

【実施例】

以下、実施例により本発明についてより詳細に検討するが、本発明はこれらの実施例により何等限定されるものではない。

【実施例1】ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的遺伝子の単離及び配列解析

ドーパミン産生ニューロン前駆細胞特異的な遺伝子を単離するために、E12.5マウス中脳腹側領域を背腹方向にさらに二つの領域に切り分けて、ドーパミン産生ニューロンを含む最も腹側の領域に特異的に発現する遺伝子をサブトラクション(N-RDA)法により同定した。単離した断片の一つはLrp4/CorinをコードするcDNA断片であった。Lrp4はII型膜貫通蛋白質をコードしている(図1)。

【0083】

1. N-RDA法

1-1. アダプターの調製

下記のオリゴヌクレオチドをアニーリングさせ、100 μ Mに調製した。

(ad2: ad2S+ad2A、ad3: ad3S+ad3A、ad4: ad4S+ad4A、ad5: ad5S+ad5A、ad13: ad13S+ad13A)

ad2S: cagctccacaacctacatcattccgt (配列番号:5)

ad2A: acggaatgatgt (配列番号:6)

ad3S: gtccatcttctctctgagactctggt (配列番号:7)

ad3A: accagagtctca (配列番号:8)

ad4S: ctgatgggtgtcttctgtgagtgtgt (配列番号:9)

ad4A: acacactcacag (配列番号:10)

ad5S: ccagcatcgagaatcagtgtagacagt (配列番号:11)

ad5A: actgtcacactg (配列番号:12)

ad13S: gtcgatgaacttcgactgtcgatcgt (配列番号:13)

ad13A: acgatcgacagt (配列番号:14)

【 0 0 8 4 】

1-2. cDNA合成

日本SLCより入手したマウス12.5日胚より中脳腹側を切り出し、さらに背腹方向に2つの領域に切り分けた。RNeasy mini kit (Qiagen)を用いて全RNAを調製し、cDNA synthesis kit (TAKARA)を用いて二本鎖cDNAを合成した。制限酵素Rsa Iで消化したのち、ad2を付加し、ad2Sをプライマーとして、15サイクルのPCRでcDNAを増幅した。増幅条件は72℃で5分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及び72℃で2分の反応を15サイクル行い、最後に72℃で2分インキュベートした。N-RDAのPCRはすべて以下の反応液組成で行った。

10×ExTaq	5 μ l
2.5mM dNTP	4 μ l
ExTaq	0.25 μ l
100 μ M primer	0.5 μ l
cDNA	2 μ l
蒸留水	38.25 μ l

【 0 0 8 5 】

1-3. Driverの作製

ad2Sで増幅したcDNAをさらに5サイクルのPCRで増幅した。増幅条件は94℃で2分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及び72℃で2分の反応を5サイクル行い、最後に72℃で2分インキュベートした。Qiaquick PCR purification kit (Qiagen)を用いてcDNAを精製し、RsaI消化した。1回のサブトラクションに3 μ gずつ使用した。

【 0 0 8 6 】

1-4. Testerの作製

ad2Sで増幅したcDNAをさらに5サイクルのPCRで増幅した。増幅条件は94℃で2

分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及び72℃で2分の反応を5サイクル行い、最後に72℃で2分インキュベートした。Qiaquick PCR purification kit (Qiagen)を用いてcDNAを精製し、RsaI消化した。60ngのRsaI消化cDNAにad3を付加した。

【 0 0 8 7 】

1-5. サブトラクション1回目

上記3及び4で作製したTesterおよびDriverを混合し、エタノール沈殿した後に、1xPCR buffer 1 μ lに溶解した。98℃ 5分の後、1xPCR buffer+1M NaCl 1 μ lを加えた。さらに98℃ 5分の後、68℃で16時間ハイブリダイズさせた。

ハイブリダイズさせたcDNAをad3Sをプライマーとして10サイクルのPCRで増幅した後（72℃で5分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及び72℃で2分の反応を10サイクル行った）、Mung Bean Nuclease (TAKARA)で消化し、Qiaquick PCR purification kitで精製した。さらに13サイクルのPCRで増幅した。増幅条件は94℃で2分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及び72℃で2分の反応を13サイクル行い、最後に72℃で2分インキュベートした。

【 0 0 8 8 】

1-6. 均一化

サブトラクション1回目で増幅したcDNA 8ngに2xPCR buffer 1 μ lを加えた。98℃ 5分の後、1xPCR buffer+1M NaCl 2 μ lを加えた。さらに98℃ 5分の後、68℃で16時間ハイブリダイズさせた。

ハイブリダイズさせたcDNAをRsaIで消化し、Qiaquick PCR purification kitで精製した。これをad3Sをプライマーとして11サイクルのPCRで増幅した後（94℃で2分インキュベートした後、94℃で30秒、65℃で30秒、及び72℃で2分の反応を11サイクル行い、最後に72℃で2分インキュベートした）RsaIで消化し、ad4を付加した。

【 0 0 8 9 】

1-7. サブトラクション2回目

上記6でad4を付加したcDNA 20ngをTesterとして、上記3のDriverと混合し、さらに、上記5と同様の方法でサブトラクションを行った。最終的にRsaI消化したc

DNAにad5を付加した。

【0 0 9 0】

1-8. サブトラクション3回目

上記7でad5を付加したcDNA 2ngをTesterとして、上記3のDriverと混合し、さらに、上記5と同様の方法でサブトラクションを行った。最終的にRsaI消化したcDNAにad13を付加した。

【0 0 9 1】

1-9. サブトラクション4回目

上記8でad13を付加したcDNA 2ngをTesterとして、上記3のDriverと混合し、以下、上記5と同様の方法でサブトラクションを行った。増幅したcDNAをpCRII (Invitrogen)にクローニングし、ABI3100シーケンスアナライザーを用いて塩基配列を解析した。

【0 0 9 2】

[実施例2]Lrp4遺伝子の発現解析

次に、Lrp4遺伝子を用いて以下のプロトコールによりin situハイブリダイゼーションによる発現解析を行った。

まず、マウス12.5日胚をOCTで包埋し、厚さ16 μ mの新鮮凍結切片を作製した。スライドガラス上で乾燥させた後に4%PFAで室温30分間固定した。PBSで洗浄した後、ハイブリダイゼーション (1 μ g/mlDIG化RNAプローブ、50%ホルムアミド、5xSSC, 1%SDS, 50 μ g/ml yeast RNA, 50 μ g/ml Heparin) を65度で40時間行った。その後、洗浄 (50%ホルムアミド、5xSSC, 1%SDS) を65度で行い、RNase処理 (5 μ g/ml RNase) を室温5分間行った。0.2xSSCで65度の洗浄、1xTBSTで室温の洗浄ののち、ブロッキング (Blocking reagent: Roche) を行った。アルカリフォスファターゼ標識抗DIG抗体 (DAKO) を反応させ、洗浄 (1xTBST、2mM Levamisole) の後、NBT/BCIP (DAKO) を基質として発色させた。

【0 0 9 3】

in situハイブリダイゼーションによる発現解析の結果、ドーパミン産生ニューロンの発生する時期であるE12.5で、Lrp4は中脳から後脳、脊髄にかけての腹側中心部に特異的発現していることが示された。後脳から脊髄にかけては、Shh

と同様の発現パターンを示し、オーガナイザー領域である底板(floor plate)に特異的であることが明らかになった(図2)。中脳ではShh発現領域の中でもより中心部にのみ発現が見られた(図3)。

【0094】

ニューロンの成熟マーカーであるNCAMと比較した結果、Lrp4発現細胞はNCAM陰性の脳室領域(Ventricular Zone (VZ))内の増殖前駆細胞であった。さらにドーパミンニューロンのマーカーであるチロシンヒドロキシラーゼ(tyrosine hydroxylase; TH)の発現と比較すると、THは外套層(mantle layer (ML))にのみ発現しているため、同一の細胞で両者の発現が認められることはないものの、背-腹軸方向での発現領域は完全に一致していた(図3)。一般に神経管(neural tube)内の神経細胞は、まずVZ内で増殖し、分化開始とともに分裂を停止し、その後すぐ外側のMLに移動したのちに成熟することが知られている。従って、ドーパミン産生ニューロンの前駆細胞は、TH発現領域のすぐ内側のVZ内で増殖し、分裂停止後に外側に移動してからTHを発現すると考えられる。即ち、Lrp4は中脳ではドーパミン産生ニューロンの前駆細胞に特異的に発現すると考えられる(図4及び5)。

【0095】

【発明の効果】

本発明により、分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞に特異的、且つ一過性に発現する遺伝子Lrp4が同定された。細胞における該Lrp4の発現を指標とすることにより、安全面、生存率及びネットワーク形成面の面でもパーキンソン病を含む神経変性疾患に対する移植治療に適した細胞を選択することが可能となった。また、分裂停止前のニューロン増殖前駆細胞を選択的に得られるため、成熟した細胞の求められる治療等において使用する場合であっても、in vitroで最適な状態へと容易に分化させることができる。さらに、本発明の遺伝子を用いて得られるドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞により、該細胞に特異的に発現している遺伝子を単離することが可能となった。該細胞は、パーキンソン病等の神経変性疾患に対する医薬を開発する上でも有用と考えられる。分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞という、ニューロン形成における初期の前駆細胞は、さらに、ニューロンの成熟過程、即ち、成熟過程に關与する種

々の因子を明らかにするのに役立つ。このような因子の解明は、神経変性疾患の治療に大きく貢献することが予期される。さらに、該細胞の成熟を指標として、その過程を調節(阻害または促進)するような物質のスクリーニングに用いることもできる。

【 0 0 9 6 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Eisai Co., Ltd.

<120> Lrp4/Corin dopaminergic neuronal marker

<130> E1-A0211

<140>

<141>

<160> 28

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2876

<212> DNA

<213> mouse

<400> 1

ctagtcccca ggcagacggt ccctcactcc tgtggcttgg cgtcggagac gctggcagtc 60

atgggcaggg tttccttcag cgttcgggtc agctccgtgc ggagagcccg ctgctcttgt 120
cctgggcat gctacctctc ctgcagagtc cctccaacca ccgccctccg tgcactgaac 180
ggctttggct gcgcgggggt tccgggggag actgcaggtg gagccgtcgg acccgccccc 240
ttggggaccc gtggcttcct ctccgggtcc aagttccagg ctcccggcag ctggaaggat 300
tgctttggag ccccgccctgc tccagacgtc ttgagagcag acaggagcgt gggcgagggc 360
tgtcctcaga agctgggtgac tgctaacttg ctgcgcttcc tcctgctggg gctcatcccc 420
tgcatctgcg ccctcatcgt gctgctggcc atcctgctgt cttttgtggg aacattaaaa 480
agggtttatt tcaaatcaaa tgacagtga cctttgggtca ctgatgggga agctcgagtg 540
cctgggtgta ttctgtataa tacagtttat tatgagaaca caggggccc ctctctgccc 600
cccagccagt ccactccagc ctggacaccg agagctcctt ctccagagga ccagagtcac 660
aggaacacaa gcacctgcat gaacatcact cacagccagt gtcaaattct gccctaccac 720
agcacgttgg cacctctctt gccaatgtc aaaaacatgg acatggagaa gttcctcaag 780
ttcttcacgt acctccatcg cctcagttgc tatcaacata tcctgctctt cggctgtagc 840
ctgccttcc ctgagtgcgt tgttgatggc gatgacaggc atggtcttct accctgtaga 900
tctttctgtg aggctgcaaa agaaggatgc gaatctgtcc tgggaatggg gaactcctcc 960
tggccggatt ccctcagatg ctctcagttt agggaccaca ctgagactaa cagcagtgtc 1120
agaaagagct gcttctcact gcagcaggaa catggaaagc aatcactctg tggagggggc 1180
gagagcttcc tgtgtaccag cgggctctgc gtcccaaga agctgcagtg taacggctat 1240
aatgactgtg atgactggag cgacgaggcg cattgcaact gcagcaagga tctgtttcac 1300
tgtggcacag gcaagtgcct ccactacagc ctcttgctgt atgggtacga tgactgtggg 1360
gacccgagtg acgagcaaaa ctgtgattgt aatctcacia aagagcatcg ctgtggagat 1420
gggcgctgca ttgcggctga gtgggtgtgc gatggggacc atgactgtgt ggacaagtct 1480
gatgaggtca actgctcttg tcacagccag ggcctgggtg aatgcacaag tggacagtgc 1540
atccctagca cctccagtg tgatggggac gaagactgta aggatgggag tgacgaggag 1600
aactgcagtg acagtccagc gccatgtcca gaaggagaac agggatgctt tggcagttcc 1660
tgcgtcgaat cctgtgctgg tagctctctg tgtgactcag acagcagcct gagtaactgc 1720
agtcaatgtg agcccatcac tttggaactc tgcatgaatt tgctctacaa ccatacacat 1780
tatccaaatt accttgcca cagaactcaa aaggaagcgt ccatcagctg ggagtcaccc 1840
ctttccctg ccctgtaca aaccaactgt tacaataacc tcatgttttt cgcttgacc 1900

attttggttc caaagtgtga tgtgaataca ggacaacgca tcccgcttg cagactcctg 1960
tgtgagcact ccaaagagcg ctgtgagtct gttctgggaa tcgttggcct gcagtggcct 2020
gaagacaccg actgcaatca atttccagag gaaagttcag acaatcaaac ttgcctcctg 2080
cccaatgaag atgtggaaga atgctctccg agtcacttca aatgccgctc gggacgatgc 2140
gttctgggct ccaggagatg tgacggccag gctgactgtg acgacgacag tgacgaggag 2200
aactgtggtt gtaaagagag agctctttgg gaatgtccat ttaataagca atgtctgaag 2260
catacattaa tctgcgatgg gtttccagat tgtccagaca gtatggatga aaaaaactgc 2320
tcattttgcc aagacaatga gctggaatgt gccaaccatg agtgtgtgcc gcgtgacctt 2380
tggtgcgacg gatgggtcga ctgctcagac agttctgatg aatggggctg tgtgacctc 2440
tctaaaaatg ggaactcctc ctcatgtctg actgttcaca aatctgcaa ggaacaccac 2500
gtgtgtgctg acggctggcg ggagacgttg agtcagctgg cctgcaagca gatgggttta 2560
ggagaaccgt ctgtgaccaa gctgatccca ggacaggaag gccagcagtg gctgaggttg 2620
taccccaact gggagaatct caatgggagc acctgcagg agctgctggt atacaggcac 2680
tcctgccccaa gcagaagtga gatttccctt ctgtgctcca agcaagactg tggccgcccgc 2740
cctgtgccc gaatgaacaa gaggatcctt gggggctcga ctagtcgtcc tgggaggttg 2800
ccgtggcagt gctctctgca gagtgaaccc agtggacata tctgtggctg tgtcctcatt 2860
gccaagaagt gggctctgac agttgcccatt tgctttgaag ggagagaaga cgctgatgtt 2940
tggaagtgg tatttggcat aaacaacctg gaccatccat caggcttcat gcagacccgc 3000
tttgtgaaga ccatcctgct acatccccgt tacagtcgag cagtggtaga ctatgatata 3060
agcgtggtgg agctgagcga tgatatcaat gagacaagct acgtcagacc tgtctgccta 3120
cccagtccgg aggagtatct agaaccagat acgtactgct acatcacagg ctggggccac 3180
atgggcaata aaatgccctt taagctgcag gagggagagg tccgattat ccctctggag 3240
cagtgccagt cctattttga catgaagacc atcaccaatc ggatgatctg tgctggctat 3300
gagtctggca ccgtggactc ctgcatggga gacagcggtg ggcctctggt ttgtgaacga 3360
cccgaggagc agtggacatt atttggttta acttcatggg gctccgtctg cttttccaaa 3420
gttctgggac ctggagtgtg cagcaatgtg tcttactttg tgggctggat tgaaagacaa 3480
atatatatcc agacctttct ccaaagaaa tccaaggat aatcagagac tttgtgggga 3540
aacctacatg gagaatgacc ctctgaaaca gaagcttgtc ctgccaagag ctgtacgaac 3600
aggcgtttca cggacaggac gctcaacatg caccgcaaga tctctcctgt ttgtgctaga 3660

tgagttttac tcaggcttta atctctttca acattatcat ttattaattt catgaatcct 3720
tttaaaagca cagagcaaag taggttttgt tattttgcta ggctaaccctt gaatgtagtg 3780
tgcaattacc aacccataga gacatttggg gctctagggt aacaagttat agaaagctcc 3840
ttttattact actacaagac acacacggag atacacgctg actgatctcc agtttctgct 3900
taagcccagt ggcttagggg gcacatttca gaactgatct tggagactgg cttttaattt 3960
gtagaaagcc aagagaatat atatgctttt attatttact ctactcttct aaataacttg 4020
aagaaatcat gaaagacaga gaaaggaccc acagtgttga tctagacagt tgaagttgca 4080
agaatgtaaa attctctagc caaccaaact aacactctga agtaagtaga attctatcct 4140
ttctgtattc aaattaagct taaaatctcc accagatttg ttcccgttac tgggaatttt 4200
cggagtatgt cacttagatg actgtgatgt caaaagccag gtcaatcctt gaggaaataa 4260
tttgtttgct tatgtgggaa tgaataagaa tctttccatt ccgcaaaaca cacaattaa 4320
aaaggagaaa aaaaattaa taacattcca cacccaatta attctgaaaa ttagtctgct 4380
tgtattcacc caaaacagaa aagttacaga aatatatttc aaagtgcagc aaaatgttgc 4440
atggagtata taacattttg caatttcccc ctcatgatgt ctaacatccg gtattgccat 4500
ttgcctcatt gataattaa actaaatttt aaggatgctt ttaagcactg ggccacttta 4560
tgggaatcaa ttcccaaagc aattagtggg tacaagtatt ttttccact aaaaagtttc 4620
aaaacacaaa ccttcatact aaattaatta gccagacatg aactatgtaa catgcaaagtg 4680
cctttttgaa caagtaggat gcactgttaa acttcaccag caaccaaact gcctcagtat 4740
tgcttacagg gactacctgc aattttatat gtgtattttg tactcttttt ctagatagtt 4800
caaatgcaaa acattgtttc aacccttatt ctccatgttg ttcacctctt gtcctggaat 4860
ttgttacaaa gtgtgtgtag caaatgattg tactgcggtc aggactatat gaaggtttag 4920
gaccatcggg tcggttttgt tataattgtt ggcacataat taataaaata tttttagcat 4980
tggg 5040

<210> 2

<211> 2980

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

aaatcatccg tagtgcctcc ccgggggaca cgtagaggag agaaaagcga ccaagataaa 60
agtggacaga agaataagcg agacttttta tccatgaaac agtctcctgc cctcgctccg 120
gaagagcgct accgcagagc cgggtcccca aagccggtct tgagagctga tgacaataac 180
atgggcaatg gctgctctca gaagctggcg actgctaacc tcctccggtt cctattgctg 240
gtcctgattc catgtatctg tgctctcggt ctcttgctgg tgatcctgct ttcctatggt 300
ggaacattac aaaaggtcta ttttaaatca aatgggagtg aacctttggt cactgatggt 360
gaaatccaag ggtccgatgt tattcttaca aatacaattt ataaccagag cactgtgggtg 420
tctactgcac atcccagcca acacgttcca gcctggacta cggatgcttc tctcccaggg 480
gaccaaagtc acaggaatac aagtgcctgt atgaacatca cccacagcca gtgtcagatg 540
ctgccctacc acgccagct gacacctctc ctctcagttg tcagaaacat ggaaatggaa 600
aagttcctca agtttttcac atatctccat cgcctcagtt gctatcaaca tatcatgctg 660
tttggctgta ccctcgctt ccctgagtgc atcattgatg gcgatgacag tcatggactc 720
ctgccctgta ggctcttctg tgaggctgca aaagaaggct gtgaatcagt cctggggatg 780
gtgaattact cctggccgga tttcctcaga tgctcccagt ttagaaacca aactgaaagc 840
agcaatgtca gcagaatttg ctcttcacct cagcaggaaa acggaaagca attgctctgt 900
ggaaggggtg agaactttct gtgtgccagt ggaatctgca tccccgggaa actgcaatgt 960
aatggctaca acgactgtga cgactggagt gacgaggctc attgcaactg cagcgagaat 1020
ctgtttcact gtcacacagg caagtgcctt aattacagcc ttgtgtgtga tggatatgat 1080
gactgtgggg atttgagtga tgagcaaaac tgtgattgca atcccacaac agagcatcgc 1140
tgcggggacg ggcgctgcat cgccatggag tgggtgtgtg atggtgacca cgactgtgtg 1200
gataagtccg acgaggtcaa ctgctcctgt cacagccagg gtctggtgga atgcagaaat 1260
ggacaatgta tccccagcac gtttcaatgt gatggtgacg aggactgcaa ggatgggagt 1320
gatgaggaga actgcagcgt cattcagact tcatgtcaag aaggagacca aagatgcctc 1380
tacaatccct gccttgattc atgtgggtgt agctctctct gtgaccgaa caacagtctg 1440
aataactgta gtcaatgtga accaattaca ttggaactct gcatgaattt gccctacaac 1500
agtacaagtt atccaaatta ttttggccac aggactcaaa aggaagcatc catcagctgg 1560
gagtcttctc ttttcctgc acttggtcaa accaactgtt ataaatacct catgttcttt 1620

tcttgacca ttttggtagc aaaatgtgat gtgaatacag gcgagcgtat ccctccttgc 1680
agggcattgt gtgaacactc taaagaacgc tgtgagtctg ttcttgggat tgtgggccta 1740
cagtggcctg aagacacaga ttgcagtcaa ttccagagg aaaattcaga caatcaaacc 1800
tgctgatgc ctgatgaata tgtggaagaa tgctcaccta gtcatttcaa gtgccgctca 1860
ggacagtgtg ttctggcttc cagaagatgt gatggccagg ccgactgtga cgatgacagt 1920
gatgaggaaa actgtggttg taaagagaga gatctttggg aatgtccatc caataaaca 1980
tgtttgaagc acacagtgat ctgcgatggg ttcccagact gccctgatta catggacgag 2040
aaaaactgct cattttgcca agatgatgag ctggaatgtg caaacatgc gtgtgtgtca 2100
cgtgacctgt ggtgtGatgg tgaagccgac tgctcagaca gttcagatga atgggactgt 2160
gtgacctct ctataaatgt gaactcctct tcctttctga tggttcacag agctgccaca 2220
gaacaccatg tgtgtgcaga tggctggcag gagatattga gtcagctggc ctgcaagcag 2280
atgggtttag gagaaccatc tgtgaccaa ttgatacagg aacaggagaa agagccgcgg 2340
tggctgacat tacactcaa ctgggagagc ctcaatggga ccactttaca tgaacttcta 2400
gtaaatgggc agtcttgtga gagcagaagt aaaatttctc ttctgtgtac taaacaagac 2460
tgtgggcgcc gccctgctgc ccgaatgaac aaaaggatcc ttggaggctg gacgagtcgc 2520
cctggaaggt ggccatggca gtgttctctg cagagtgaac ccagtggaca tatctgtggc 2580
tgtgtcctca ttgccaagaa gtgggttctg acagttgccc actgcttca ggggagagag 2640
aatgctgcag ttggaaagt ggtgcttggc atcaacaatc tagaccatcc atcagtgttc 2700
atgcagacac gctttgtgaa gaccatcatc ctgcatcccc gctacagtcg agcagtgggtg 2760
gactatgaca tcagcatcgt tgagctgagt gaagacatca gtgagactgg ctacgtccgg 2820
cctgtctgct tgcccaaccc ggagcagtgg ctagagcctg acacgtactg ctatatcaca 2880
ggctggggcc acatgggcaa taaaatgcca tttaagctgc aagagggaga ggtccgcatt 2940
atttctctgg aacattgtca gtcctacttt gacatgaaga ccatcaccac tcggatgata 3000
tgtgtctggc atgagtctgg cacagttgat tcatgcatgg gtgacagcgg tgggcctctt 3060
gtttgtgaga agcctggagg acggtggaca ttatttggat taacttcatg gggctccgtc 3120
tgcttttcca aagtcctggg gcctggcggt tatagtaatg tgtcatattt cgtcgaatgg 3180
attaaaagac agatttacat ccagaccttt ctctaaact aattataagg atgatcagag 3240
acttttgcca gctacactaa aagaaaatgg ccttcttgac tgtgaagagc tgcctgcaga 3300
gagctgtaca gaagcacttt tcatggacag aaatgctcaa tcgtgcactg caaatttgca 3360

tgtttgttt ggactaattt ttttcaattt attttttcac cttcattttt ctcttatttc 3420
aagttcaatg aaagacttta caaaagcaaa caaagcagac tttgtccttt tgccaggcct 3480
aacatgact gcagcacaaa attatcgact ctggcgagat ttaaaatcag gtgctacagt 3540
aacaggttat ggaatggtct cttttatcct atcacaaaaa aagacataga tatttaggct 3600
gattaattat ctctaccagt ttttgtttct caagctcagt gcatagtggg aaatttcagt 3660
gttaacattg gagacttgct tttctttttc tttttttata cccacaatt cttttttatt 3720
acacttcgaa ttttagggta cacgagcaca acgtgcaggg tagttacata tgtatacatg 3780
tgccatgttg gtgtgctgaa ccagtaact cgtcatttga tttattaaaa gccaaagataa 3840
tttcatgtt taaagtattt actattacc ctttctaag tttgcataat tctgagaact 3900
gataaaagac agcaataaaa gaccagtgtc atccatttag gtagcaagac atattgaatg 3960
caaagttctt tagatatcaa tattaacact tgacattatt ggacccccca ttctggatgt 4020
atatcaagat cataatttta tagaagagtc tctatagaac tgtcctcata gctgggtttg 4080
ttcaggatat atgagttggc tgattgagac tgcaacaact acatctatat ttatgggcaa 4140
tattttgttt tacttatgtg gcaaagaact ggatattaaa ctttgcaaaa gagaatttag 4200
atgagagatg caatttttta aaaagaaaat taatttgcac ccctcgttta attaaattta 4260
tttttcagtt ttcttgcgtt catccatacc aacaaagtca taaagagcat attttagagc 4320
acagtaagac tttgcatgga gtaaaacatt ttgtaatttt cctcaaaaga tgtttaatat 4380
ctggtttctt ctcatggta attaaaattt tagaaatgat ttttagctct aggccacttt 4440
acgcaactca atttctgaag caattagtgg taaaaagtat tttcccccac taaaaaactt 4500
taaaacacaa atcttcatat atacttaatt taattagtca ggcatccatt ttgcctttta 4560
aacaactagg attccctact aacctccacc agcaacctgg actgcctcag cattccaaat 4620
agatactacc tgcaatttta tacatgtatt tttgtatctt ttctgtgtgt aaacatagtt 4680
gaaattcaaa aagttgtagc aatttctata ctattcatct cctgtccttc agtttgtata 4740
aacctaagga gagtgtgaaa tccagcaact gaattgtggg cacgattgta tgaaagttca 4800
agaacatatg tcagttttgt tacagttgta gctacatact caatgtatca acttttagcc 4860
tgctcaactt aggctcagt aaatatatat attatactta ttttaaataa ttcttaatac 4940
aaataaaatg gta 4953

<210> 3

<211> 700

<212> PRT

<213> mouse

<400> 3

Met Gly Arg Val Ser Phe Ser Val Arg Val Ser Ser Val Arg Arg Ala

1

5

10

15

Arg Cys Ser Cys Pro Gly Arg Cys Tyr Leu Ser Cys Arg Val Pro Pro

20

25

30

Thr Thr Ala Leu Arg Ala Leu Asn Gly Leu Gly Cys Ala Gly Val Pro

35

40

45

Gly Glu Thr Ala Gly Gly Ala Val Gly Pro Gly Pro Leu Gly Thr Arg

50

55

60

Gly Phe Leu Ser Gly Ser Lys Phe Gln Ala Pro Gly Ser Trp Lys Asp

65

70

75

80

Cys Phe Gly Ala Pro Pro Ala Pro Asp Val Leu Arg Ala Asp Arg Ser

85

90

95

Val Gly Glu Gly Cys Pro Gln Lys Leu Val Thr Ala Asn Leu Leu Arg

100

105

110

Phe Leu Leu Leu Val Leu Ile Pro Cys Ile Cys Ala Leu Ile Val Leu

115

120

125

Leu Ala Ile Leu Leu Ser Phe Val Gly Thr Leu Lys Arg Val Tyr Phe
130 135 140

Lys Ser Asn Asp Ser Glu Pro Leu Val Thr Asp Gly Glu Asp Arg Val
145 150 155 160

Pro Gly Val Ile Pro Val Asn Thr Val Tyr Tyr Glu Asn Thr Gly Ala
165 170 175

Pro Ser Leu Pro Pro Ser Gln Ser Thr Pro Ala Trp Thr Pro Arg Ala
180 185 190

Pro Ser Pro Glu Asp Gln Ser His Arg Asn Thr Ser Thr Cys Met Asn
195 200 205

Ile Thr His Ser Gln Cys Gln Ile Leu Pro Tyr His Ser Thr Leu Ala
210 215 220

Pro Leu Leu Pro Ile Val Lys Asn Met Asp Met Glu Lys Phe Leu Lys
225 230 235 240

Phe Phe Thr Tyr Leu His Arg Leu Ser Cys Tyr Gln His Ile Leu Leu
245 250 255

Phe Gly Cys Ser Leu Aal Phe Pro Glu Cys Val Val Asp Gly Asp Asp
260 265 270

Arg His Gly Leu Leu Pro Cys Arg Ser Phe Cys Glu Ala Ala Lys Glu

285

300

320

335

350

365

380

400

415

430

Asp His Asp Cys Val Asp Lys Ser Asp Glu Val Asn Cys Ser Cys His
435 440 445

Ser Gln Gly Leu Val Glu Cys Thr Ser Gly Gln Cys Ile Pro Ser Thr
450 455 460

Phe Gln Cys Asp Gly Asp Glu Asp Cys Lys Asp Gly Ser Asp Glu Glu
465 470 475 480

Asn Cys Ser Asp Ser Gln Thr Pro Cys Pro Glu Gly Glu Gln Gly Cys
485 490 495

Phe Gly Ser Ser Cys Val Glu Ser Cys Ala Gly Ser Ser Leu Cys Asp
500 505 510

Ser Asp Ser Ser Leu Ser Asn Cys Ser Gln Cys Glu Pro Ile Thr Leu
515 520 525

Glu Leu Cys Met Asn Leu Leu Tyr Asn His Thr His Tyr Pro Asn Tyr
530 535 540

Leu Gly His Arg Thr Gln Lys Glu Ala Ser Ile Ser Trp Glu Ser Ser
545 550 555 560

Leu Phe Pro Ala Leu Val Gln Thr Asn Cys Tyr Lys Tyr Leu Met Phe
565 570 575

Phe Ala Cys Thr Ile Leu Val Pro Lys Cys Asp Val Asn Thr Gly Gln
580 585 590

Arg Ile Pro Pro Cys Arg Leu Leu Cys Glu His Ser Lys Glu Arg Cys
595 600 605

Glu Ser Val Leu Gly Ile Val Gly Leu Gln Trp Pro Glu Asp Thr Asp
610 615 620

Cys Asn Gln Phe Pro Glu Glu Ser Ser Asp Asn Gln Thr Cys Leu Leu
625 630 635 640

Pro Asn Glu Asp Val Glu Glu Cys Ser Pro Ser His Phe Lys Cys Arg
645 650 655

Ser Gly Arg Cys Val Leu Gly Ser Arg Arg Cys Asp Gly Gln Ala Asp
660 665 670

Cys Asp Asp Asp Ser Asp Glu Glu Asn Cys Gly Cys Lys Glu Arg Ala
675 680 685

Leu Trp Glu Cys Phe Asn Lys Gln Cys Leu Lys His Thr Leu Ile Cys
690 695 700

Asp Gly Phe Pro Asp Cys Pro Asp Ser Met Asp Glu Lys Asn Cys Ser
705 710 715

Phe Cys Gln Asp Asn Glu Leu Glu Cys Ala Asn His Glu Cys Val Pro
720 725 730

Arg Asp Leu Trp Cys Asp Gly Trp Val Asp Cys Ser Asp Ser Ser Asp

735

740

745

Glu Trp Gly Cys Val Thr Leu Ser Lys Asn Gly Asn Ser Ser Ser Leu

750

755

760

Leu Thr Val His Lys Ser Ala Lys Glu His His Val Cys Ala Asp Gly

765

770

775

Trp Arg Glu Thr Leu Ser Gln Leu Ala Cys Lys Gln Met Gly Leu Gly

780

785

790

795

Glu Pro Ser Val Thr Lys Leu Ile Pro Gly Gln Glu Gly Gln Gln Trp

800

805

810

Trp Leu Arg Leu Tyr Pro Asn Trp Glu Asn Leu Asn Gly Ser Thr Leu

815

820

825

Gln Leu Leu Val Tyr Arg His Ser Cys Pro Ser Arg Ser Glu Ile Ser

830

835

840

Ler Ler Cys Ser Lys Gln Asp Cys Gly Arg Arg Pro Ala Ala Arg Met

845

850

855

Asn Lys Arg Ile Leu Gly Gly Arg Thr Ser Arg Pro Gly Arg Trp Pro

860

865

870

875

Trp Gln Cys Ser Leu Gln Ser Glu Pro Ser Gly His Ile Cys Gly Cer

880

885

890

Val Leu Ile Ala Lys Lys Trp Val Leu Thr Val Ala His Cys Phe Glu
895 900 905

Glu Gly Arg Glu Asp Ala Asp Val Trp Lys Val Val Phe Gly Ile Asn
910 915 920

Asn Leu Asp His Pro Ser Gly Phe Met Gln Thr Arg Phe Val Lys Thr
925 930 935

Ile Leu Leu His Pro Arg Tyr Ser Arg Ala Val Val Asp Tyr Asp Ile
940 945 950 955

Ser Val Val Glu Leu Ser Asp Asp Ile Asn Glu Thr Ser Tyr Val Arg
960 965 970

Pro Val Cys Leu Pro Ser Pro Glu Glu Tyr Leu Glu Pro Asp Thr Tyr
975 980 985

Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly His Met Gly Asn Lys Met Pro Phe Lys
990 995 1000

Leu Gln Glu Gly Glu Val Arg Ile Ile Pro Leu Glu Gln Cys Gln Ser
1005 1010 1015

Tyr Asp Met Lys Thr Ile Thr Asn Arg Met Ile Cys Ala Gly Tyr Glu
1020 1025 1030 1035

Ser Gly Thr Val Asp Ser Cys Met Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val
1040 1045 1050

Cys Arg Pro Gly Gly Gln Trp Thr Leu Phe Gly Leu Thr Ser Trp Gly
1055 1060 1065

Ser Val Cys Phe Ser Lys Val Leu Gly Pro Gly Val Tyr Ser Asn Val
1070 1075 1080

Ser Tyr Phe Val Gly Trp Ile Glu Arg Gln Ile Tyr Ile Gln Thr Phe
1085 1090 1095

Leu Gln Lys Lys Ser Gln Gly
1100 1105

<210> 4

<211> 708

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Lys Gln Ser Pro Ala Leu Ala Pro Glu Glu Arg Tyr Arg Arg Ala
1 5 10 15

Gly Ser Pro Lys Pro Val Leu Arg Ala Asp Asp Asn Asn Met Gly Asn
20 25 30

Gly Cys Ser Gln Lys Leu Ala Thr Ala Asn Leu Leu Arg Phe Leu Leu
35 40 45

Leu Val Leu Ile Pro Cys Ile Cys Ala Leu Val Leu Leu Leu Val Ile
50 55 60

Leu Leu Ser Tyr Val Gly Thr Leu Gln Lys Val Tyr Phe Lys Ser Asn
65 70 75 80

Gly Ser Glu Pro Leu Val Thr Asp Gly Glu Ile Gln Gly Ser Asp Val
85 90 95

Ile Leu Thr Asn Thr Ile Tyr Asn Gln Ser Thr Val Val Ser Thr Ala
100 105 110

His Pro Asp Gln His Val Pro Ala Trp Thr Thr Asp Ala Ser Leu Pro
115 120 125

Gly Asp Gln Ser His Arg Asn Thr Ser Ala Cys Met Asn Ile Thr His
130 135 140

Ser Gln Cys Gln Met Leu Pro Tyr His Ala Thr Leu Thr Pro Leu Leu
145 150 155 160

Ser Val Val Arg Asn Met Glu Met Glu Lys Phe Leu Lys Phe Phe Tyr
165 170 175

Leu His Arg Ler Ser Cys Tyr Gln His Ile Met Leu Phe Gly Cys Thr
180 185 190

Leu Ala Phe Pro Glu Cys Ile Ile Asp Gly Asp Asp Ser His Gly Leu
195 200 205

Leu Pro Cys Arg Ser Phe Cys Glu Ala Ala Lys Gly Cys Glu Ser Val
210 215 220

Leu Gly Met Val Asn Tyr Ser Trp Pro Asp Phe Leu Arg Cys Ser Gln
225 230 235 240

Phe Arg Asn Gln Thr Glu Ser Ser Asn Val Ser Arg Ile Cys Phe Ser
245 250 255

Pro Gln Gln Glu Asn Gly Lys Gln Leu Leu Cys Gly Arg Gly Glu Asn
260 265 270

Phe Leu Cys Ala Ser Gly Ile Cys Ile Pro Gly Lys Leu Gln Cys Asn
275 280 285

Gly Tyr Asn Asp Cys Asp Asp Trp Ser Asp Glu Ala His Cys Asn Cys
290 295 300

Ser Glu Asn Leu Phe His Cys His Thr Gly Lys Cys Leu Asn Tyr Ser
305 310 315 320

Leu Val Cys Asp Gly Tyr Asp Asp Cys Gly Asp Ler Ser Asp Glu Gln
325 330 335

Cys Asp Cys Asp Pro Thr Thr Glu His Arg Cys Gly Asp Gly Arg Cys
340 345 350

Ile Ala Met Glu Trp Val Cys Asp Gly Asp His Asp Cys Val Asp Lys

355

360

365

Ser Asp Glu Val Asn Cys Ser Cys His Ser Gln Gly Leu Val Glu Cys

370

375

380

Arg Asn Gly Gln Cys Ile Pro Ser Thr Phe Gln Cys Asp Gly Asp Glu

385

390

395

400

Asp Cys Lys Asp Gly Ser Asp Glu Glu Asn Cys Ser Val Ile Gln Thr

405

410

415

Ser Cys Gln Glu Gly Asp Gln Arg Cys Leu Tyr Asn Pro Cys Leu Asp

420

425

430

Ser Cys Gly Gly Ser Ser Leu Cys Asp Pro Asn Asn Ser Leu Asn Asn

435

440

445

Cys Ser Gln Cys Glu Pro Ile Thr Leu Glu Leu Cys Met Asn Leu Pro

450

455

460

Tyr Asn Ser Thr Ser Tyr Pro Asn Tyr Phe Gly His Arg Thr Gln Lys

465

470

475

480

Glu Ala Ser Ile Ser Trp Glu Ser Ser Leu Phe Pro Ala Leu Val Gln

485

490

495

Thr Asn Cys Tyr Lys Tyr Leu Met Phe Phe Ser Cys Thr Ile Leu Val

500

505

510

Pro Lys Cys Asp Val Asn Thr Gly Glu Arg Ile Pro Pro Cys Arg Ala
515 520 525

Leu Cys Glu His Ser Lys Glu Arg Cys Glu Ser Val Leu Gly Ile Val
530 535 540

Gly Leu Gln Trp Pro Glu Asp Thr Asp Cys Ser Gln Phe Pro Glu Glu
545 550 555 560

Asn Ser Asp Asn Gln Thr Cys Leu Met Pro Asp Glu Tyr Val Glu Glu
565 570 575

Cys Ser Pro Ser His Phe Lys Cys Arg Ser Gly Gln Cys Val Leu Ala
580 585 590

Ser Arg Arg Cys Asp Gly Gln Ala Asp Cys Asp Asp Asp Ser Asp Glu
595 600 605

Glu Asn Cys Gly Cys Lys Glu Arg Asp Leu Trp Glu Cys Pro Ser Asn
610 615 620

Lys Gln Cys Leu Lys His Thr Val Ile Cys Asp Gly Phe Pro Asp Cys
625 630 635 640

Pro Asp Tyr Met Asp Glu Lys Asn Cys Ser Phe Cys Gln Asp Asp Glu
645 650 655

Leu Glu Cys Ala Asn His Ala Cys Val Ser Arg Asp Leu Trp Cys Asp

660

665

670

Gly Glu Ala Asp Cys Ser Asp Ser Ser Asp Glu Trp Asp Cys Val Thr

675

680

685

Leu Ser Ile Asn Val Asn Ser Ser Ser Phe Leu Met Val His Arg Ala

690

695

700

Ala Thr Glu His His Val Cys Ala Asp Gly Trp Gln Glu Ile Leu Ser

705

710

715

720

Gln Leu Ala Cys Lys Gln Met Gly Leu Gly Glu Pro Ser Val Thr Lys

725

730

735

Leu Ile Gln Glu Gln Glu Lys Glu Pro Arg Trp Leu Thr Leu His Ser

740

745

750

Asn Trp Glu Ser Leu Asn Gly Thr Thr Leu His Glu Leu Leu Val Asn

755

760

765

Gly Gln Ser Cys Glu Ser Arg Ser Lys Ile Ser Leu Leu Cys Thr Lys

770

775

780

Gln Cys Gly Arg Arg Pro Ala Ala Arg Met Asn Lys Arg Ile Leu Gly

785

790

795

800

Gly Arg Thr Ser Arg Pro Gly Arg Trp Pro Trp Gln Cys Ser Leu Gln

805

810

815

Ser Glu Pro Ser Gly His Ile Cys Gly Cys Val Leu Ile Ala Lys Lys
820 825 830

Trp Val Leu Thr Val Ala His Cys Phe Glu Arg Glu Asn Ala Ala Val
835 840 845

Trp Lys Val Val Leu Gly Ile Asn As Leu Asp His Pro Ser Phe Val
850 855 860

Phe Met Gln Thr Arg Phe Val Lys Thr Ile Ile Leu His Pro Arg Tyr
865 870 875 880

Ser Arg Ala Val Val Asp Tyr Asp Ile Ser Ile Val Glu Leu Ser Glu
885 890 895

Asp Ile Ser Glu Thr Gly Tyr Val Arg Pro Val Cys Leu Pro Asn Pro
900 905 910

Glu Gln Trp Leu Glu Pro Asp Thr Tyr Cys Tyr Ile Thr Gly Trp Gly
915 920 925

His Met Gly Asn Lys Met Pro Phe Lys Leu Gln Glu Gly Glu Val Arg
930 935 940

Ile Ile Ser Leu Glu His Cys Gln Ser Tyr Phe Asp Met Lys Thr Ile
945 950 955 960

Thr Thr Arg Met Ile Cys Ala Gly Tyr Glu Ser Gly Thr Val Asp Ser
965 970 975

Cys Met Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu Lys Pro Gly Gly
980 985 990

Arg Trp Thr Leu Phe Gly Leu Thr Ser Trp Gly Ser Val Cys Phe Ser
995 1000 1005

Lys Val Leu Gly Pro Gly Val Tyr Ser Asn Val Ser Tyr Phe Val Glu
1010 1015 1020

Trp Ile Lys Arg Gln Ile Tyr Ile Gln Thr Phe Leu Leu Asn
1025 1030 1035

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 5

cagctccaca acctacatca ttccgt

26

<210> 6

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 6

acggaatgat gt

12

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 7

gtccatcttc tctctgagac tctggt

26

<210> 8

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 8

accagagtct ca

12

<210> 9

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 9

ctgatgggtg tcttctgtga gtgtgt

26

<210> 10

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 10

acacactcac ag

12

<210> 11

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 11

ccagcatcga gaatcagtgt gacagt

26

<210> 12

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 12

actgtcacac tg

12

<210> 13

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 13

gtcgatgaac ttcgactgtc gatcgt

26

<210> 14

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:adapter for
cDNA amplification

<400> 14

acgatcgaca gt

12

【図面の簡単な説明】

【図1】 Lrp4の構造を模式的に示す図である。TM:膜貫通ドメイン、FRI:f
rizzeliedドメイン、LDLa:LDLレセプタードメイン、SR:スカベンジャーレセプタ

ードメイン、Pro:セリンプロテアーゼドメイン。

【図 2】 Lrp4及びShhのmRNAのE12.5マウス後脳腹側及び脊髄における発現をin situハイブリダイゼーション法により解析した結果を示す写真である。

【図 3】 Lrp4、Shh、チロシンヒドロキシラーゼ (TH)、及びNCAMのmRNAのE12.5マウス中脳腹側における発現をin situハイブリダイゼーション法により解析した結果を示す写真である。

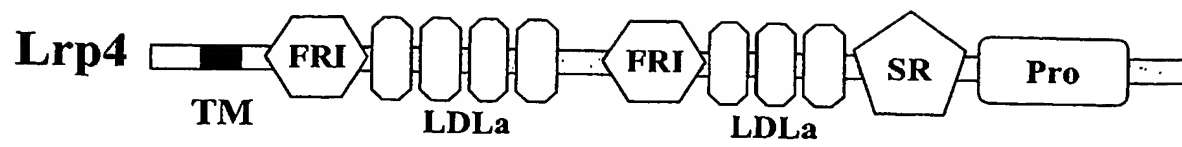
【図 4】 Lrp4の中脳における発現パターンを模式的に示す図である。VZ:v entricular zone、ML:mantle layer。

【図 5】 ドーパミン産生ニューロンの発生から成熟までの間におけるLrp4、65B13、TH、NCAM及びDATの発現時期を模式的に示す図である。

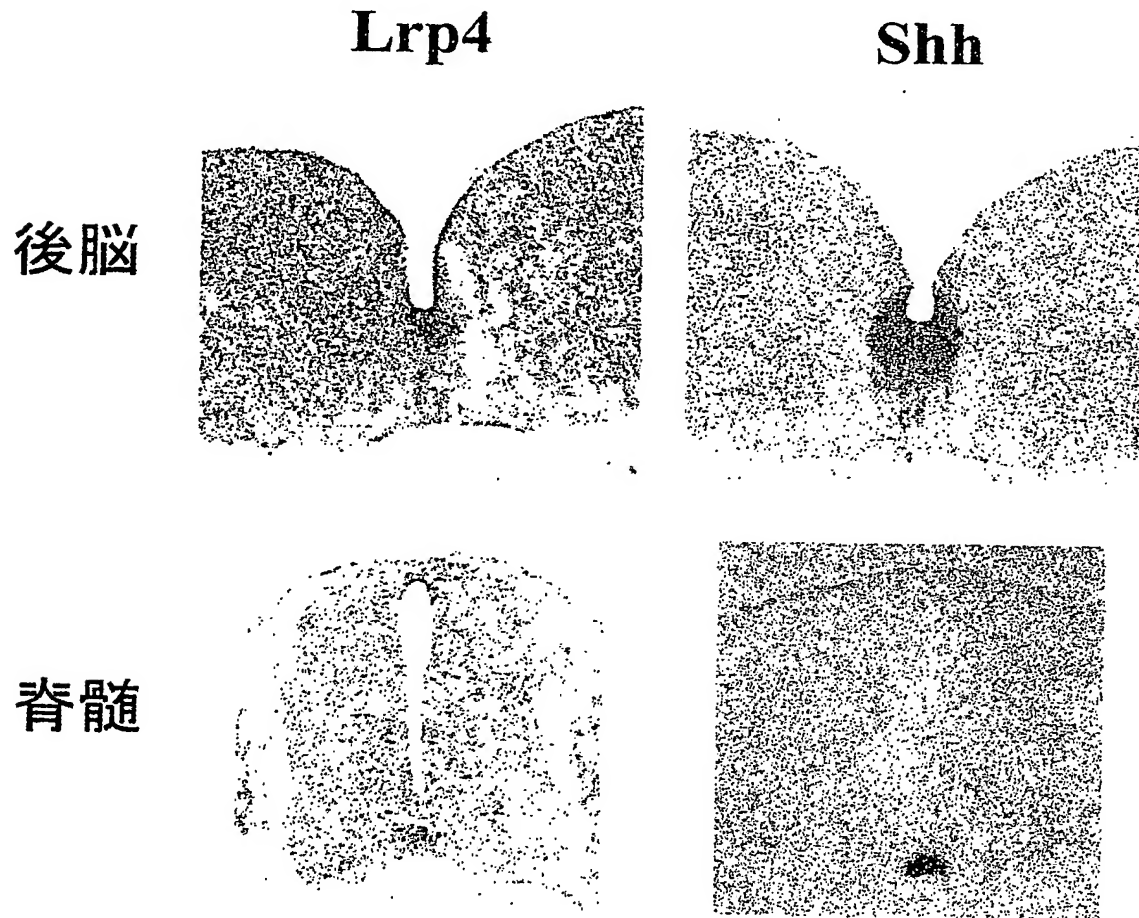
【図 6】 抗Lrp4抗体を用いたドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞の分離及び活用法を示す模式図である。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【図 3】

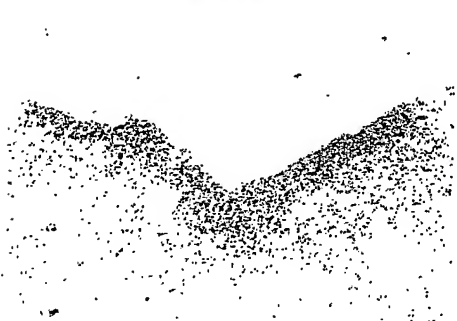
Lrp4



TH



Shh

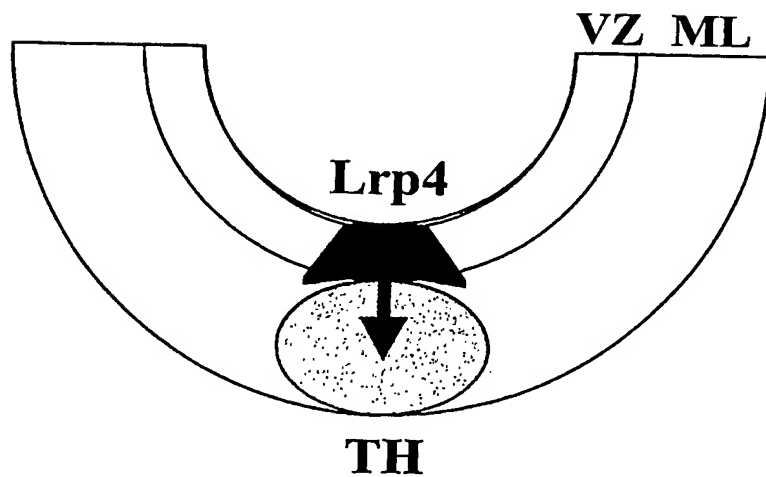


NCAM

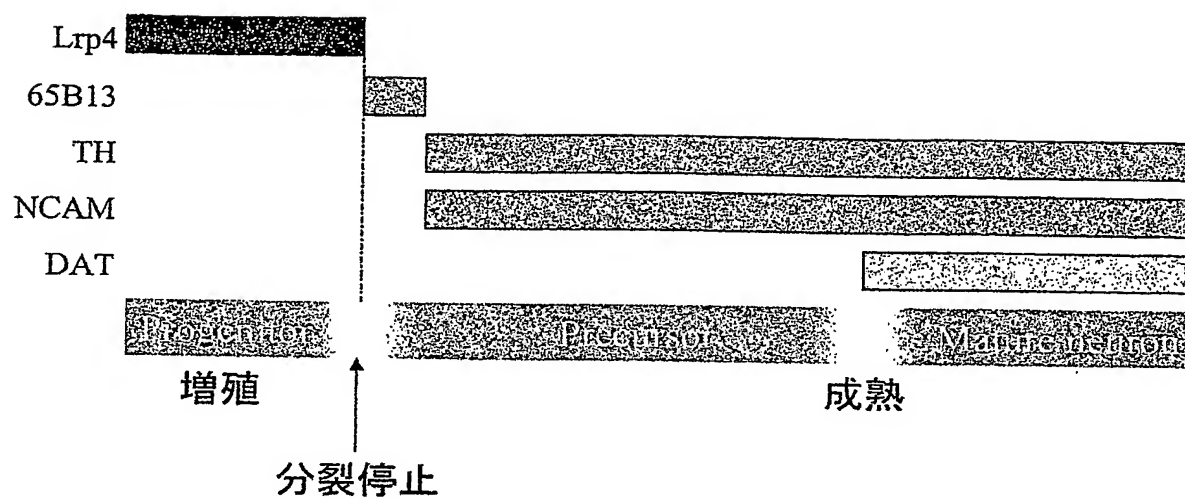


【図 4】

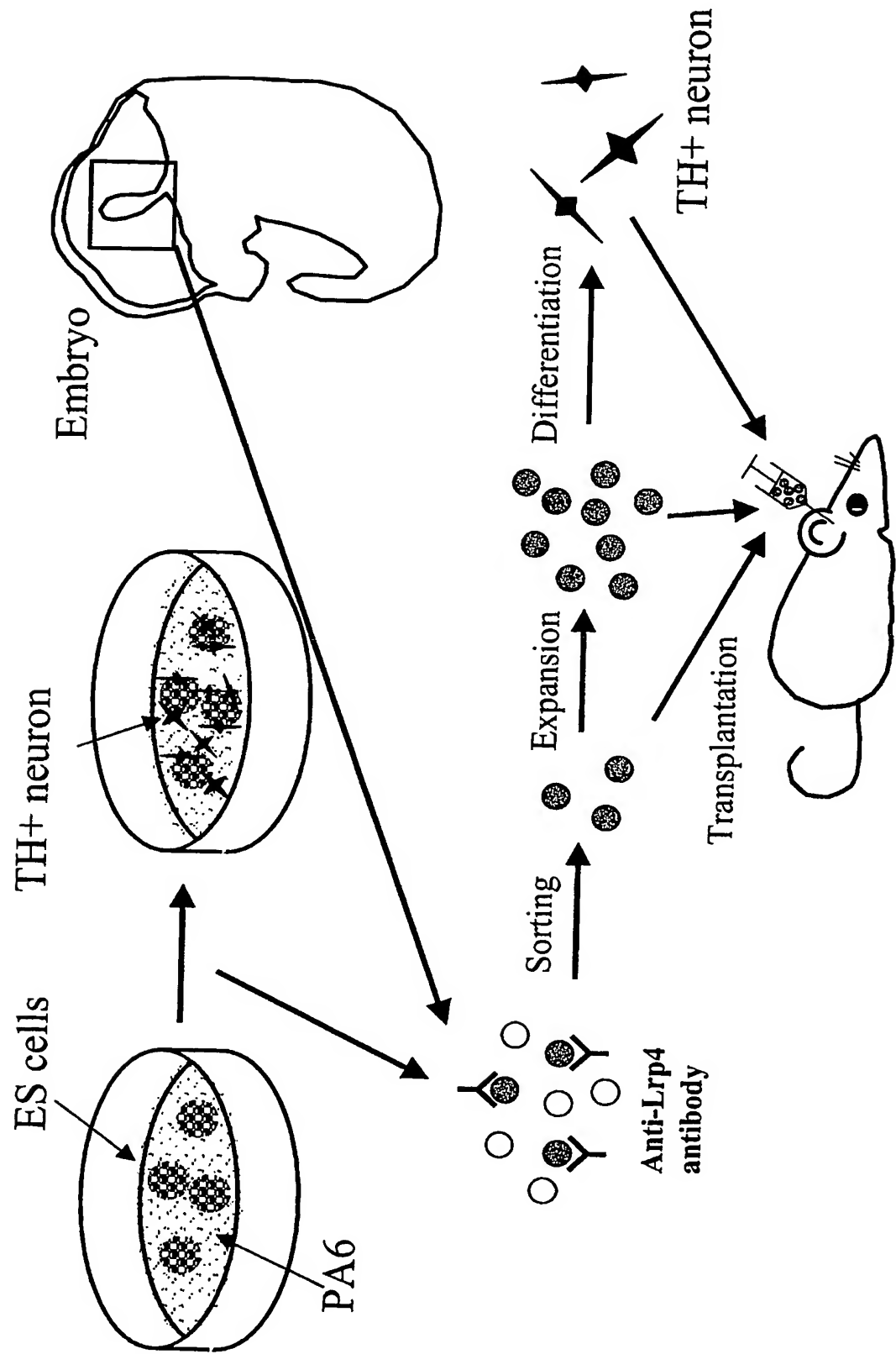
中脳腹側



【図 5】



【図 6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 神経細胞移植治療においては、安全性の面では目的の細胞種のみからなる細胞群、そして腫瘍形成の危険性を考慮すれば分裂停止後の神経細胞が好ましいと考えられる。さらに、移植先での生存、正しいネットワーク形成能等を考慮するとより早期の前駆細胞により治療効果が増大されると期待される。

【解決手段】 本発明により、分裂停止前のドーパミン産生ニューロン増殖前駆細胞に発現する遺伝子Lrp4が同定された。細胞における該Lrp4の発現を指標とすることにより、安全面、生存率及びネットワーク形成能の面でもパーキンソン病を含む神経変性疾患に対する移植治療に適した細胞を選択することが可能となる。

【選択図】 図6

特願 2 0 0 3 - 0 1 6 7 9 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 0 2 1 7]

1. 変更年月日	1 9 9 0 年 8 月 2 9 日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都文京区小石川 4 丁目 6 番 1 0 号
氏 名	エーザイ株式会社